



41
2ej-

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA**

Desarrollo y Validación de la Técnica de
Cromatografía en Capa Fina como Método
Analítico para Evaluar la Estabilidad de
Captopril y Nifedipina en Formas
Farmacéuticas Sólidas

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
OLGA CELIA PEREZ GARCIA



MEXICO, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Introducción	1
I. Fundamentación del tema	3
A. Propiedades Físico-químicas.	6
1. Captopril	6
a. Principio Activo	6
b. Tabletas	7
2. Nifedípina	8
a. Principio Activo	8
b. Cápsulas de gelatina blanda	9
B. Validación	10
1. Definición	10
a. Procesos	10
b. Métodos Analíticos	10
2. Parámetros Evaluados	10
a. Exactitud	10
b. Precisión	11
I. Repetibilidad	11
II. Reproducibilidad	12
c. Linealidad	13
d. Especificidad	14
e. Límite de Detección	15
C. Estabilidad Química	15
1. Definición	15
2. Estudio de Estabilidad	16
a. Definición	16
D. Cromatografía	16
1. Cromatografía en Capa Fina	19
II. Planteamiento del Problema	20
III. Objetivos	22
IV. Hipótesis	23

V.	Parte Experimental	24
	A. Material	24
	B. Equipo	24
	C. Reactivos	24
	D. Metodología	25
	1. Técnica de Cromatografía en Capa Fina	25
	a. Captopril	25
	b. Nifedipina	26
	2. Validación de la Cromatografía en Capa Fina	28
	a. Captopril	28
	1) Especificidad	28
	b. Nifedipina	28
	1) Especificidad	28
	2) Exactitud	29
	3) Precisión	29
	4) Linearidad	30
	5) Límite de detección	30
VI.	Resultados	31
	A. Captopril	31
	1. Desarrollo de la técnica cromatográfica	31
	2. Validación de la Cromatografía en Capa Fina	34
	a. Resultados de la Especificidad	34
	B. Nifedipina	42
	1. Desarrollo de la técnica cromatográfica	42
	2. Validación de la técnica de Cromatografía en Capa Fina	44
	a. Resultados de la Especificidad.	44
	b. Resultados de Exactitud.	54
	c. Resultados de Precisión	55
	1) Repetibilidad	55
	2) Reproducibilidad	56
	d. Resultados de Linearidad	58
	e. Resultados del Límite de Detección	61
VII.	Discusión de Resultados.	63
	A. Captopril	63

1. Desarrollo de la Técnica Cromatográfica	63
2. Validación de la Cromatografía en Capa Fina . .	63
B. Nifedipina	64
1. Desarrollo de la Técnica Cromatográfica	64
2. Validación de la Cromatografía en Capa Fina . .	65
VIII. Conclusiones	67
IX. Bibliografía	69
Anexo 1.	72
Anexo 2.	78
Indice de Figuras	82
Indice de Gráficas	82
Indice de Tablas	82

INTRODUCCION

El incremento de enfermedades cardiovasculares en los habitantes de la ciudad de México debido a diversas causas (stress, contaminación, mala alimentación, etc.) han propiciado que el uso de medicamentos en el tratamiento de éstas sea mayor, así como el número de activos y de presentaciones disponibles en el mercado, por lo que cuando un medicamento es incluido en el cuadro básico de medicamentos del Sector Salud, y los Laboratorios Farmacéuticos los producen, para que estos puedan ser comercializados requieren la autorización de la Secretaría de Salud.

Dentro de los requisitos que debe reunir un medicamento para ser autorizada su venta y distribución se incluyen los Estudios de Estabilidad Química ya que en base a estos se obtiene el período de vida útil o caducidad que se le otorga al medicamento; este estudio debe realizarse con Métodos Analíticos Validados, cuando no se cuentan con ellos es necesario desarrollarlos de acuerdo a las características del activo, de la forma farmacéutica y de los recursos materiales disponibles.

Este trabajo reporta el desarrollo de los Métodos Analíticos por Cromatografía en Capa Fina para los principios activos *Enalapril* y *Nifedipina* en formas farmacéuticas sólidas (tabletas y cápsulas de gelatina blanda respectivamente), así como la validación para el método cromatográfico de *Nifedipina*.

Por otra parte para *Enalapril* tabletas, con el método desarrollado no fue posible realizar la valoración del activo por

problemas, tales como las interacciones de este con las fases estacionarias probadas, por lo cual no fué posible validar el método cromatográfico.

Sin embargo el método de cromatografía en capa fina desarrollado y validado para las cápsulas de gelatina blanda de *Nifedipina* detecta los cambios de concentración del activo en diferentes condiciones como temperatura y humedad, por lo que se concluye que éste es específico y puede ser utilizado como un método para evaluar la estabilidad química de la *Nifedipina*.

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

Los nuevos productos farmacéuticos deben cumplir con especificaciones mínimas requeridas por la Secretaría de Salud, referentes a Estabilidad, que a su vez deben sustentarse en métodos de análisis adecuados.

Resulta necesario contar con Métodos Analíticos Validados¹ que permitan la evaluación de la Estabilidad Química de *Captopril* en tabletas y de *Nifedipina* en cápsulas de gelatina blanda, siendo ambos medicamentos de reciente inclusión en el Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud, empleándose en el área de Cardiología.

El *Captopril* (N-[(2-S)-3-mercaptopropil]-L-prolina) se emplea para disminuir la Hipertensión Arterial en pacientes que no responden a otros hipotensores como las combinaciones de β -bloqueadores y vasodilatadores; el *Captopril* debe su acción antihipertensora a la inhibición de la enzima peptidil-peptidasa que es la encargada de la transformación de Angiotensina I a Angiotensina II (sustancia presora de gran potencia), del sistema Renina-Angiotensina que interviene en la mantención de la presión sanguínea y de la modulación del balance de sodio en el organismo.

De los inhibidores del sistema Renina-Angiotensina actualmente disponibles están, como se indicaba anteriormente, los β -bloqueadores pero su falta de especificidad y la necesidad de una administración parenteral, entre otros factores, los ha limitado en su uso; sin embargo el *Captopril* por ser muy activo y

¹ "Proyecto de Norma Técnica sobre los Requisitos Mínimos para las Pruebas de Estabilidad para Medicamentos y Materia Prima", Anteproyecto elaborado por el Colegio Nacional de QFB, A.C., 1991, revisado preliminarmente por la Secretaría de Salud.

eficaz por vía oral, además de tener pocos efectos secundarios se ha convertido en un medicamento de elección para el tratamiento de la Hipertensión Arterial.²

De la información con que se cuenta acerca de éste fármaco la mayoría versa sobre su farmacología ya que se trata de un activo relativamente nuevo, sintetizado por Cushman y colaboradores en 1977,³ referente a los métodos analíticos la mayoría se enfoca a la valoración del activo como materia prima, encontrándose reportados métodos espectrofotométricos, volumétricos y cromatográficos, entre éstas técnicas la de gases y la de alta presión de líquidos, en relación a la capa fina los reportes indican que son empleadas para pruebas de identidad y pureza del fármaco.

En estudios realizados por Timmins,⁴ en el que evalúa la Estabilidad de *Captopril* en solución acuosa, efectúa la valoración química mediante la cromatografía de gases, aportando datos de gran valor, ya que indica los factores que afectan al fármaco, así como las vías degradativas observadas durante su estudio.

Actualmente no se cuenta con información que reporte la estabilidad química del *Captopril* en formas farmacéuticas sólidas (Tabletas), evaluada mediante Cromatografía en Capa Fina por lo que resulta conveniente el desarrollo y validación de esta técnica como un método analítico alternativo.

En lo concerniente a la *Nifedipina* (éster dimetilico del ácido 1,4 -dihidro-2,6- dimetil- 4-(2-nitrofenil)-3,5- piridín carboxílico) que se emplea en el tratamiento y prevención de la insuficiencia coronaria crónica o aguda, en casos de angina de pecho, de post-infarto y como agente antihipertensivo.

La *Nifedipina* a concentraciones bajas bloquea la entrada de iones calcio a el músculo liso vascular y arterias sanguíneas, lo que conduce a la vasodilatación coronaria y alivio del espasmo; la

² Goodman y Gilman. "The Pharmacological Basis of Therapeutics" 8a.edition, Pergamon Prees, USA, 1990, pag.774.

³ Ibid. pag.652.

⁴ Timmins, P. "Factors affecting Captopril stability in aqueous solution", Int.J.Pharm. vol.11, 1982, pag.329-336.

vasodilatación también se produce en vasos periféricos lo que disminuye la resistencia vascular periférica y por lo tanto desciende la postcarga, éste es un mecanismo adicional que contribuye al efecto antianginoso y a la eficiencia en la angina crónica inducida por el esfuerzo físico, gracias a esta última acción los bloqueadores de calcio como la *Nifedipina* también pueden ser eficaces en el tratamiento de la Hipertensión, por ser un potente vasodilatador coronario.⁵

Los estudios realizados a este fármaco desde su síntesis en 1968 han estado enfocados principalmente a la evaluación de su farmacología,⁶ y en especial a su farmacocinética en donde se ha empleado la Cromatografía en Capa Fina de manera semicuantitativa para detectar a sus metabolitos en orina⁷; en otros estudios reportados, como el de Zhang⁸ y Musumarra⁹, hacen uso de la Cromatografía en Capa Fina para la identificación de *Nifedipina* y otros compuestos análogos terapéuticamente, en otras fuentes bibliográficas se reportan métodos analíticos volumétricos, espectrofotométricos y colorimétricos para la evaluación del fármaco como materia prima.^{10, 11, 12}

⁵ Goth., "Farmacología Médica" 11a edición, Doyma, España, 1984, pag.730.

⁶ Bowman y Rand, "Farmacología, Bases Bioquímicas y Patológicas, Aplicaciones Clínicas", 2a. edición, Interamericana, México, 1984, cap.22.

⁷ Klaus, "Pharmacokinetics and Metabolism of Nifedipine", Hypertension, supp.11, vol.5, No.4, 1983, pag.18-24.

⁸ Zhang, "Identification of Nifedipine and its analogs", Yiqua Gongye, 18, (6), 1987, pag.226-227.

⁹ Musumarra, "Qualitative organic analysis identification of drugs by principal components analysis of standardized thin-layer chromatographic data in four eluent systems", J.Chromatogr., vol.350, 1985, pag.151-168.

¹⁰ Patel, "A rapid colorimetric method for the estimation of Nifedipine", Indian J. Pharm. Sci., 46 (3), 1986, pag.126-128.

¹¹ Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a. edición, Secretaría de Salud, México, 1988.

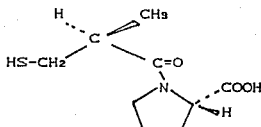
¹² USP XXII, USA, 1990.

A. Propiedades Físico-químicas

1. CAPTOPRIL

a. Principio Activo.

1) Fórmula Desarrollada:



2) Fórmula Condensada: $C_9H_{15}NO_3S$.

3) Nombres Químicos:

N-[(2S)-3-mercapto-2-metilpropil]-L-prolina

1-(3-mercapto-2-D-metil-1-oxopropil)-L-prolina (S,S)

[Chem. Abst. 62571-86-2]

4) Peso Molecular: 217,29

5) Propiedades Físicas:

a) Descripción: polvo cristalino blanco, de sabor ácido y con olor característico a mercaptano.

b) Solubilidad:

Ligeramente soluble en agua y éter etílico

Soluble en metanol, etanol, cloroformo, isopropanol y cloruro de metileno.

c) Punto de Fusión: $103^{\circ}C - 106^{\circ}C$.

d) Rotación óptica: en solución etanólica al 2% $\alpha_D = -126^{\circ} - 133^{\circ}$.

e) Constantes de Disociación ácida, indicada como valores de pKa:

$pK_{a1}=3.7$

$pK_{a2}=9.8$.

6) Vías de Degradación:

Se oxida a Disulfuro de Captopril en presencia de humedad, de metales pesados, en medio alcalino y por el oxígeno del aire.

7) Farmacodinamia:

a) Absorción: rápida y luego lenta, 75% del activo se absorbe en el tracto gastro intestinal.

b) Unión a proteínas: se une de un 25% a 30%, principalmente a Albumina.

c) Biotransformación: hepática.

d) Vida media : no menos de 3 horas.

e) Eliminación: de 40% a 50% renal, sin cambio, el resto en metabolitos (mezcla de disulfuros).

b. Tabletas.

1) Formulación

Cada tableta contiene:

Captopril 25 mg

Excipiente c. b. p. . . 1 tableta

Excipientes:

Almidón de maíz

Lactosa anhidra

Primojel (almidón glicolato sódico)

Estereato de Magnesio

Aerosil-200 (Dióxido de silicio)

2) Especificaciones como Producto Terminado *

Aspecto: tabletas uniformes, de color ligeramente crema.

Friabilidad: no más del 0.8%

Dureza: no menos de 3 Kg.

Humedad: no más del 2% por la técnica de Karl Fischer.

Desintegración: no más de 30 minutos.

Peso Promedio: 120 mg/tableta.

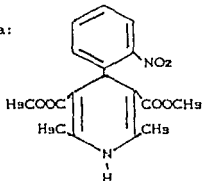
Valoración: 25 mg/tableta (90-110%)

*Nota: especificaciones establecidas en el lugar donde se desarrollo el trabajo experimental.

2. NIFEDIPINA

a. Principio activo.

1) Fórmula Desarrollada:



2) Fórmula Condensada: C₁₇ H₁₈ N₂ O₆.

3) Nombres Químicos:

Ester dimetilico del ácido 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-3,5-piridín carboxílico.

Dimetil 1,4- dihidro-2,6- dimetil-4-(o-nitrofenil)-3,5-
piridín carboxilato.

[Chem. Abst. 21829-25-4].

4) Peso Molecular: 346.34

5) Propiedades Físicas:

a) Descripción: polvo amarillo microcristalino, inodoro, muy fotosensible.

b) Solubilidad:

Insoluble en agua.

Moderadamente soluble en metanol y etanol.

Facilmente soluble en acetona, cloruro de metileno y cloroformo.

c) Punto de Fusión: 171°C - 175°C.

6) Vías de Degradación:

Por exposición a la luz blanca se oxida a 4-(2-nitrosfenil)-2,6-dimetil piridín-3,5-dicarboxilato dimetilico.

Por exposición prolongada a la radiación ultravioleta se oxida 4-(2-nitrofenil)-2,6-dimetil piridín- dicarboxilato dimetilico.

7) Farmacodinamia:

a) Absorción: más del 90% de la dosis es absorbida, sin embargo la biodisponibilidad se reduce hasta un valor de entre 60% y 75%.

b) Unión a Proteínas: de 92% al 98%.

c) Biotransformación: hepática, con un pronunciado efecto del primer paso.

d) Vida Media: bifásica, en la fase corta con un tiempo de 2.5 a 3 horas y la fase larga con un tiempo de 5 horas.

e) Eliminación: renal, alcanzando un 80% (como metabolitos y trazas sin cambios); biliar/fecal con un 20% como metabolitos.

b. Cápsulas de Gelatina Blanda.

1) Formulación

Cada cápsula contiene:

Nifedipina 10 mg

Excipiente c.b.p. . . . 1 cápsula

Excipientes:

Polietilenglicol-400

Glicerol

Esencia de menta

Sacarina sódica

2) Especificaciones para Producto Terminado *

Aspecto: Cápsulas oblongas rojas, conteniendo líquido de color rojizo y con olor a menta.

pH de la solución: 5.0 -8.0.

Densidad de la solución: 1.13-1.15 g/ml.

Humedad de la solución: no más del 12% por la técnica de Karl Fischer.

Desintegración: no más de 30 minutos.

Peso promedio: 700 mg/cápsula.

Valoración: 10 mg/cápsula (90 - 110 %).

*Nota: especificaciones establecidas en el lugar donde se desarrolló el trabajo experimental.

B. Validación

1. DEFINICION

a. Procesos.

"Pone a prueba el proceso con el objeto de determinar sus parámetros óptimos de operación y su metodología de control para así reproducir eficazmente lote tras lote un producto farmacéutico acorde a las especificaciones de calidad establecidas".¹³

b. Métodos Analíticos.

"Se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas".¹⁴

2. Parámetros Evaluados

a. Exactitud.

1) Definición

"Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el % de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia".¹⁵

2) Desarrollo Experimental

Se determina con los datos, de cuando menos, seis placebos cargados, de manera independiente, con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100 por ciento, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

3) Evaluación

Se calcula el porcentaje de recobro y el coeficiente de variación (CV), con los datos obtenidos, (ver anexo 1).

¹³ Carreón Zepeda, J., Validación de Procesos de Fabricación de Productos No Estériles, David Curiel B. (editor). Validación de Procesos Farmacéuticos, México D.F., 1982.

¹⁴ "Validación: Métodos Analíticos", comité de elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaría de Salud, México, 1991.

¹⁵ Ibid. pag.2

La evaluación también se puede efectuar empleando el contraste de hipótesis mediante el estadígrafo de contraste t de *student*, al comparar una t experimental con una t de tablas. (ver anexo 1).

4) Criterio

El porcentaje de recobro debe ser mayor o igual al 98% y menor o igual al 102%, es decir estar comprendido en este intervalo. El valor del CV debe ser menor o igual al 2%, para indicar que el método puede ser considerado como exacto.

En lo que respecta al contraste de hipótesis, para considerar al método exacto, no se debe rechazar H_0 y la t experimental no deberá ser mayor que la t de tablas.

b. Precisión.

1) Definición

"Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación".¹⁶

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

T: Repetibilidad

1) Definición

"Es la precisión expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.)".¹⁷

2) Desarrollo Experimental

Se efectúa con el conjunto de datos obtenidos de muestras independientes de placebos cargados (cuando menos seis), con la concentración equivalente al contenido teórico.

¹⁶ "Validación: Métodos Analíticos", comité de elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaría de Salud, México, 1991.

¹⁷ Ibid. pag.2

3) Evaluación

Con los datos obtenidos se calcula el porcentaje de recobro y el CV. También se puede inferir la repetibilidad empleando el contraste de hipótesis y al estadístico de prueba χ^2 cuadrada (χ^2) y evaluando una χ^2 experimental y una χ^2 de tablas, (ver anexo 1).

4) Criterio

El porcentaje de recobro debe estar comprendido entre el 98% y el 102%, así mismo el CV debe ser menor o igual al 2% para considerar al método como preciso.

En lo que respecta al contraste de hipótesis no se debe rechazar H_0 y la χ^2 experimental deberá ser menor o igual a la χ^2 de tablas.

II. Reproducibilidad

1) Definición

"Es la precisión expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.)".¹⁸

2) Desarrollo Experimental

Se determina de una muestra homogénea de placebo cargado cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por 2 analistas en 2 días y por triplicado.

3) Evaluación

Con los datos obtenidos se calcula el CV total. También se puede evaluar la reproducibilidad mediante un análisis de varianza, y determinar la variación de los factores analista, día e interacción analista-día, con el empleo de la distribución F (ver anexo 1), evaluándose para cada factor una F experimental y una F de tablas.

4) Criterio

El CV total debe de ser menor o igual al 2%.

¹⁸ "Validación: Métodos Analíticos", comité de elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaría de Salud, México, 1991.

La F experimental para cada uno de los factores evaluados debe ser menor que la F correspondiente de tablas.

c. Linealidad.

1) Definición

"La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado".¹⁹

2) Desarrollo Experimental

Se determina a partir de placebos cargados de cuando menos tres diferentes niveles de concentración de la sustancia de interés, cada nivel de manera independiente, como mínimo cada nivel con tres muestras.

3) Evaluación

Con los datos obtenidos se calcula la cantidad recuperada para posteriormente proceder a graficar cantidad adicionada vs cantidad recuperada y poder calcular la pendiente (m), la ordenada al origen (a) y el coeficiente de correlación (r), mediante una regresión lineal.

También puede evaluarse la linealidad mediante el porcentaje de recobro y el CV a cada nivel de concentración empleada. (ver anexo 1).

4) Criterio

Para que un método analítico sea considerado como lineal en el rango de concentración empleado el valor de la pendiente (m) debe aproximarse a 1, la ordenada al origen (a) ser cercana a 0 y el coeficiente de correlación (r) mayor de 0.99.

Los % de recobro a cada nivel y los globales de todo el intervalo deben estar comprendidos entre un 98% y 102% así como los valores de CV deben ser menores o iguales a un 2%.

¹⁹ "Validación: Métodos Analíticos", comité de elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaría de Salud, México, 1981.

d. Especificidad.

1) Definición

"Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida unicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra".²⁰

2) Desarrollo Experimental

En caso de contar con los posibles productos de degradación, preparar muestras de placebo añadido de éstos y la sustancia de interés y analizar con el método propuesto.

Si no se cuenta con los productos de degradación es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones, de acuerdo con las propiedades físico-químicas del compuesto, sugiriendose los siguientes métodos:

- Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto en un horno a 70°C-120°C o a 20°C por debajo del punto de fusión de la sustancia de interés durante un número de días apropiado.

- Exponer la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto a la luz ultravioleta o a la luz fluorescente y/o a humedad.

- Si es necesario, hacer soluciones de la sustancia de interés ajustando el pH de 1-2 y/o a 10-12 y colocarlas a 60°-80°C durante 2-4 semanas.

- Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semisólidas puede degradarse por oxidación (con peróxido de hidrógeno) y permanecer 2-4 semanas a temperatura ambiente.

3) Criterio

Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran en la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

²⁰

"Validación: Métodos Analíticos", comité de elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaría de Salud, México, 1991.

e. Limite de Detección

1) Definición

"Es la mínima concentración de una sustancia en la muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas".²¹

2) Desarrollo Experimental

Varia de acuerdo al método analítico, del proceso instrumental, o de acuerdo a las diferentes técnicas que son usadas. Se puede efectuar comparando los resultados del análisis de muestras a una concentración conocida (expresada en % ppm o µg) con muestras blanco, o bien mediante la evaluación de placebos cargados a concentraciones menores al 25% de la teórica, por triplicado.

3) Evaluación

Con los datos obtenidos se calcula la cantidad recuperada y se grafica como en el parametro de linealidad, calcular pendiente (m) ordenada al origen (a), coeficiente de correlación (r) y error típico de estimación ($\hat{S}_{y/x}$). (Ver anexo 1).

3) Criterio

En la gráfica construida al trazar una paralela a una distancia de $1.96 * \hat{S}_{y/x}$ con respecto al valor de Y, el intercepto con el eje de la ordenada se considera como el limite de detección.

C. Estabilidad Química

1. DEFINICION

"Propiedad de una forma farmacéutica contenida en un determinado material de empaque para mantener entre límites especificados y durante el tiempo de almacenamiento y uso, las características físicas, químicas, microbiológicas, terapéuticas y tóxicas que tenía en el momento de ser fabricada".²²

²¹ "Validación: Métodos Analíticos", comité de elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaría de Salud, México, 1991.

²² "Proyecto de Norma Técnica sobre los requisitos mínimos para las pruebas de Estabilidad para medicamentos y materia prima". Anteproyecto elaborado por el Col. Nac. de QFB AC, México, 1991. Revisado preliminarmente por la Secretaría de Salud.

2. ESTUDIO DE ESTABILIDAD

a. Definición

"Serie de pruebas y/o ensayos que permiten pronosticar o establecer la vida útil y determina las condiciones de almacenamiento".²³

b. Estudio de Estabilidad Acelerada

1) Definición

"Método o métodos validados por medio de los cuales la estabilidad de una formulación a temperatura ambiente puede predecirse, por almacenamiento de ésta, bajo condiciones que aceleren el cambio de una manera definida y pronosticable".²⁴

2) Características

El producto en estudio es sometido a condiciones ambientales exageradas, principalmente a elevadas temperaturas, durante un tiempo mínimo de tres meses, con los datos que se obtienen se puede pronosticar la vida útil (con caracter transitorio).

D. Cromatografía

El término cromatografía es difícil de definir rigurosamente debido a la variedad de sistemas y técnicas a que ha sido aplicado. La característica común de todas ellas es que los componentes de la muestra se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es fija y se denomina "estacionaria", mientras que la otra se desplaza, filtra o fluye sobre la superficie, a través de los intersticios de la fase fija, y se designa fase "móvil".

En su sentido más amplio la cromatografía designa al proceso

²³ "Proyecto de Norma Técnica sobre los requisitos mínimos para las pruebas de Estabilidad de medicamentos y materia prima", anteproyecto elaborado por Col. Nac. de QFB AC., México, 1991, revisado preliminarmente por Secretaría de Salud.

²⁴ Ibid. pag.3.

físico-químico de separación, basado en la diferencia de velocidades y equilibrio heterogéneo que se establece cuando emigran los componentes de una mezcla a través de una fase estacionaria bajo la influencia de una fase móvil.

La fase estacionaria puede ser sólida ó líquida y la fase móvil líquida ó gaseosa, y de acuerdo a los mecanismos de distribución de los componentes de la muestra entre las dos fases se pueden efectuar las siguientes combinaciones:

Fase móvil	Fase estacionaria.	Mecanismo de Distribución.	Cromatografía.
gas	líquido	Partición	Gases
gas	sólido	Adsorción	Gases
líquido	sólido	Adsorción	Capa Fina Columna
líquido	líquido	Partición	Papel Columna

Cromatografía de Partición. Se establece cuando la fase estacionaria es un líquido que se mantiene fijo por adsorción sobre un sólido inerte y poroso, en tanto que la fase móvil es un gas o líquido. La fase estacionaria esta permanentemente saturada con la fase móvil y viceversa, de tal manera que la separación se define por la solubilidad relativa de los componentes de la muestra en las dos fases.

Cromatografía de Adsorción. Cuando la fase estacionaria es un sólido se efectua un proceso de adsorción y la separación se realiza mediante adsorciones y desorciones sucesivas de la muestra entre ambas fases. De acuerdo a la diferencia de afinidad de los compuestos con la fase estacionaria se lleva a cabo la separación de tal manera que los más adsorbidos se desplazan menos que los que se adsorben poco, esta diferencia esta dada por el

coeficiente de distribución (K), que se define de la siguiente manera:

$$K = \frac{\text{cantidad de soluto por unidad de fase estacionaria}}{\text{cantidad de soluto por unidad de fase móvil}}$$

La siguiente curva muestra una isoterma de adsorción típica que relaciona la cantidad de soluto que es adsorbido sobre la superficie de un sólido con la concentración del soluto en la solución que hace contacto con el sólido.



Concentración del soluto en la fase estacionaria (Cs).
Concentración del soluto en la fase móvil (Cm).

En la cromatografía gas-líquido, el mecanismo de distribución se caracteriza por la partición del soluto, definido por la presión de vapor parcial del soluto en solución.

En la cromatografía gas-sólido normalmente el mecanismo de distribución es la adsorción, pero puede también ser capturada dentro de la estructura microscópica del sólido o por una reacción química reversible con el sólido.

En la cromatografía líquido-sólido el mecanismo generalmente es la adsorción sobre la superficie del sólido o por una reacción reversible que resulta del intercambio de iones o de la formación de complejos.

En la cromatografía líquido-líquido el mecanismo de distribución es la partición del soluto, definida por la solubilidad relativa en los dos líquidos.

También los métodos cromatográficos se dividen en tres categorías dependiendo de como se introduce la muestra y como se desplaza a través de la fase estacionaria, siendo estas:

1) Análisis por Elución. La fase móvil inerte fluye a través de la placa o columna arrastrando los componentes de la muestra que ha sido adicionada en una sola porción y se van separando en

zonas, conforme fluye el disolvente.

2) Análisis por Desplazamiento. Se emplea una fase móvil activa para desplazar la muestra, que se adsorbe más fuertemente que los constituyentes de la mezcla por separar, este desplazador sustituye completamente a los componentes de la muestra en la fase estacionaria y los obliga a migrar por el cromatograma.

3) Análisis Frontal. Se observa cuando se efectúa la aplicación continua de una mezcla (componentes-fase móvil), de tal manera que uno de los componentes se va adsorbiendo fuertemente en la parte superior de la fase estacionaria (cromatografía de columna) mientras que los otros fluyen por el cromatograma.

1. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina es la técnica mediante la cual se logra la separación de los componentes de una muestra y consiste en la aplicación de una sustancia o mezcla de sustancias en solución en la base de una placa, la que es puesta en contacto con un disolvente o mezcla de disolventes, fase móvil, y que asciende por capilaridad a través del material adherido a la placa, siguiendo un proceso de adsorción. Cuando el frente de elución alcanza la parte superior de la placa, se interrumpe el ascenso y se evapora la fase móvil de la placa, para proceder al revelado (si es necesario) y análisis del cromatograma.

Durante el análisis de un cromatograma se emplea el Factor de Retardo (R_f) como un parámetro de referencia y comparación para evaluar el desplazamiento de la(s) sustancia(s) analizada(s) y esta definido como:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por una sustancia}}{\text{distancia recorrida por el sistema de elución}}$$

las distancias evaluadas desde el punto de aplicación.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Todo producto farmacéutico debe cumplir con especificaciones de identidad, efectividad, pureza, potencia e inocuidad, así mismo es importante que mantenga sus características físicas, químicas, microbiológicas, terapéuticas y tóxicas, asegurando la integridad de la formulación durante un tiempo determinado para que durante este lapso, el medicamento cumpla con los fines para los que fue creado.²⁵

Un medicamento puede ser alterado o modificado por las condiciones de almacenamiento, por lo que es un requisito realizar estudios de estabilidad para poder pronosticar y establecer mediante pruebas a diferentes condiciones la vida útil y las condiciones óptimas de almacenamiento para que el medicamento no sufra disminución en su contenido de principio activo y por ende la disminución de la potencia farmacológica y terapéutica del fármaco, es decir asegurar la integridad de la formulación en el material de empaque.

Para poder realizar la evaluación de la estabilidad química de un medicamento se requieren de métodos analíticos, la elección de estos depende de la naturaleza química del fármaco, de la complejidad de la forma farmacéutica, de la disponibilidad de equipo, instrumentos y reactivos, así como de su validez. Dentro de los métodos analíticos empleados para evaluar la estabilidad química se encuentra la Cromatografía.

A través de la Cromatografía se puede realizar la separación, cuantificación y/o detección de una gran variedad de sustancias aún si estas se encuentran en concentraciones de microgramos, como pueden estar los productos de degradación durante un estudio de estabilidad de un medicamento.

²⁵

“Proyecto de Norma Técnica sobre los Requisitos Mínimos para las Pruebas de Estabilidad de Medicamentos y Materia Prima”. Anteproyecto elaborado por el Col. Nac. de QFB A.C., México, 1991, revisado preliminarmente por la Secretaría de Salud.

Al ser el Captopril (tabletas) y la Nifedipina (cápsulas de gelatina blanda), medicamentos recientemente incluidos en el Cuadro Básico de Medicamentos surge la necesidad de desarrollar métodos analíticos que permitan la evaluación química de estos y ser capaces de detectar productos de degradación. La cromatografía en capa fina es el método de elección por ser: sensible, reproducible, sencillo, rápido y económico, accesible a todos los Laboratorios Farmacéuticos.

III. OBJETIVOS

1. Desarrollar un Método Analítico utilizando la Técnica de Cromatografía en Capa Fina para Evaluar la Estabilidad Química de Captopril en tabletas.
2. Desarrollar un Método Analítico utilizando la Técnica de Cromatografía en Capa Fina para Evaluar la Estabilidad de Nifedipina en cápsulas de gelatina blanda.
3. Validar los Métodos Analíticos desarrollados.

IV. HIPOTESIS

En base a las formulaciones y de acuerdo a las propiedades físicoquímicas de los principios activos (Captopril y Nifedipina) se establecerán los Métodos Analíticos por Cromatografía en Capa Fina que Evaluarán la Estabilidad Química de los mismos en tabletas y cápsulas de gelatina blanda respectivamente.

V. PARTE EXPERIMENTAL

A. Material

Cromatoplasmas de Silica Gel GF254 de 20x20 cm. y 0.25 mm de grosor (Alugram G/UV254)

Cámaras de Elución de vidrio de 20x20x10 cm.

Micropipetas de 500, 100 y 50 μ l.

Matraces Volumétricos de 10 y 25 ml.

Matraces Erlenmeyer de 125 ml.

Pipetas Volumétricas de 5 y 10 ml.

Picnómetro de 10 ml.

Embudos de vidrio, talle corto.

Tubos de ensaye.

Probetas de 100 ml.

Vasos de precipitado de 50 y 100 ml.

B. Equipo

Balanza Analítica (Sartorius 2004MP, d=0.01 mg)

Lámpara reveladora UV-25 (UVGL-25 254/366)

Espectrofotómetro UV/VIS (Perkin-Elmer Lambda 3A)

Potenciometro (Beckman ϕ 34pH Meter)

Titulador Automático Karl-Fischer (Mettler DL18)

Friabilizador Elecsa

Desintegrador Elecsa

Estufas de Estabilidad a 30°, 45° y 60°C.

Cámara Climática a 37° C y 70% HR (Clafit Humicab 80)

Parrillas de agitación

C. Reactivos

Acetato de etilo	r. a.	merck
Acido acético glacial	r. a.	merck
Acido sulfúrico	r. a.	merck
Benceno	r. a.	merck

Cloruro de metileno	r. a.	merck
Hidróxido de amonio (28%)	r. a.	merck
Hidróxido de sodio (hojuelas)	r. a.	merck
Metanol	r. a.	merck
Peróxido de hidrógeno (30%)	r. a.	merck
Tetracloruro de carbono	r. a.	merck
Agua destilada		
Cristales de Iodo	r. a.	merck
Estándar secundario de Captopril con referencia a estándar primario USP.		
Estándar secundario de Nifedipina con referencia a estándar primario USP.		

D. Metodología

1. TECNICA DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

a. Captopril

1) Preparación de las soluciones

a) Solución de referencia.

Se preparó una solución volumétrica de concentración 10 mg/ml en una mezcla de etanol:agua (1:1).

b) Solución de la Muestra

Con el polvo obtenido de la pulverización de no menos de 20 tabletas, se pesó el equivalente a 250 mg de Captopril, transfiriéndose a un matraz volumétrico de 25 ml, se disolvió y aforó al volumen con la mezcla de etanol:agua (1:1).

c) Sistema de Elución

Se preparó la solución eluyente, con la mezcla de Benceno y Ácido Acético glacial en una relación de 70:30.

2) Procedimiento

a) En una placa cromatográfica de 8x20 cm y a una altura de 2 cm de la base se aplicaron 25 µl de la solución de referencia y de la solución problema, en carriles separados.

b) Se dejó secar por 5 minutos la cromatoplaque y se procedió a la elución de la misma.

c) La cámara de elución se saturó durante 30 mín. con 30 ml del

sistema de elución, dejando desarrollar la cromatoplaaca hasta unos 2 cm antes de el límite superior de la placa.

d) Al término de la elución se sacó la placa de la cámara de elución, dejandose evaporar los disolventes hasta que no se percibió el olor a ácido acético, se procedió al revelador de la cromatoplaaca empleando una cámara saturada durante 5 min. con vapores de iodo.

e) Una vez revelado el cromatograma se efectuó el cálculo del factor de retardo (R_f) para cada una de las manchas observadas.

b. Nifedipina

1) Preparación de soluciones.

Nota: las soluciones se protegieron de la luz, empleando material cubierto de actinio o cubriéndolo con papel oscuro.

a) Solución de Referencia.

Se pesaron 12 mg de Nifedipina sustancia de referencia, en un matraz volumétrico de 10 ml, adicionando 5 ml de cloruro de metileno, disolviendo y aforando con metanol.

b) Solución de la muestra

Se virtió cuantitativamente en un matraz volumétrico de 25 ml el equivalente al contenido de tres cápsulas de Nifedipina, adicionando 10 ml de cloruro de metileno, se mezcló y llevó al al aforo con metanol, a una concentración aproximada de 1.2 mg/ml.

c) Sistema de Elución

Se mezcló en la cámara de elución acetato de etilo, tetracloruro de carbono e hidróxido de amonio, en una relación de 80:60:1.

2) Procedimiento

a) En una placa cromatográfica de 20x20 previamente dividida en carriles de 4 cm., se aplicó a 2 cm de la base, 250 μ l de la solución de referencia, y por triplicado la solución de la muestra, usandose el último carril como blanco.

b) Se dejarón evaporar los disolventes de las muestras aplicadas por 5 min., protegiendo la placa de la luz.

c) Se procedió a la elución de la placa introduciendola en la cámara la cual se saturó previamente por 30 min. con 60 ml del sistema de elución, la cámara fue protegida con un paño negro, durante el desarrollo, aproximadamente 45 min., hasta unos 2 cm antes del final de la placa.

d) Se sacó la placa de la cámara y se dejaron evaporar los disolventes (aprox. 10 min.), posteriormente esta se observó con la lámpara de UV a 254 mn marcando rápidamente 0.3 cm en torno de las manchas principales, con valores aproximados de $R_f \times 100$ de 64.5.

e) Se realizó el raspado de las manchas, depositando cada una en un matraz erlenmeyer de 125 ml, se adicionaron volumétricamente 10 ml de metanol y se agitaron mecánicamente por 5 min.

f) Se filtraron las muestras obtenidas a través de papel filtro (Whatman No. 41), previamente humedecido con metanol, a tubos de ensayo perfectamente identificados, se eliminaron los primeros 2 ml del filtrado, efectuandose tanto para la solución de referencia, las tres muestras y el blanco.

g) Se ajustó el espectrofotómetro a 350 mn empleando el filtrado de la "muestra" blanco y se determinó la absorbancia de las soluciones finales (filtradas), en celdas de 1 cm.

h) En base a las absorbancias obtenidas se calculó el contenido de principio activo en las cápsulas de gelatina blanda (mg/cap) mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{A_p \times \text{mg Std} \times 0.25\text{ml} \times \text{Pot. Std.} \times 25\text{ml} \times 400\text{mg} \times 10\text{ml}}{A_s \times 10\text{ml} \times 10\text{ml} \times 1200\text{mg} \times 100 \times 0.25\text{ml}}$$

donde:

A_p =Absorbancia del problema

A_s =Absorbancia de la solución de referencia

mg Std=miligramos de la sustancia de referencia

Pot. Std.=Potencia de la sustancia de referencia

1200mg=Peso teórico del contenido de tres cápsulas

400mg=Peso teórico del contenido de una cápsula

2. VALIDACION DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

a. Captopril

1) Especificidad

Para determinar la especificidad de la técnica se analizaron muestras de materia prima, tabletas de Captopril y una formulación placebo degradadas bajo las siguientes condiciones:

- a) Degradación en medio ácido. Empleando una solución de ácido clorhídrico 10 N en metanol y calentando a reflujo por 2 horas.
- b) Degradación en medio alcalino. Empleando una solución 10 N de Hidróxido de Sodio en metanol y calentando a reflujo por 2 horas.
- c) Degradación con una solución de peróxido de hidrógeno al 10% en metanol y calentando a reflujo por 2 horas.
- d) Exposición a la luz por dos semanas.
- e) Exposición a la radiación ultravioleta 254nm por dos semanas.

Con la técnica cromatográfica desarrollada se analizaron las muestras degradadas y simultáneamente muestras intactas.

b. Nifedipina

1) Especificidad

La especificidad del método para ser empleado en pruebas de estabilidad se determinó de la siguiente manera:

a) Muestras empleadas:

Sustancia de Referencia, Placebo, Placebo cargado, Sustancia de Referencia degradada, Placebo degradado y Placebo cargado degradado.

b) Condiciones de degradación:

-Degradación ácida -las muestras se calentaron a reflujo durante 2 horas en una solución 10 N de ácido sulfúrico en metanol.

Degradación alcalina -las muestras se calentaron a reflujo durante 2 horas en una solución de hidróxido de sodio 10 N en metanol.

Degradación con una solución de peróxido de hidrógeno al 10% en metanol calentando a reflujo por 2 horas.

Degradación por exposición a la luz natural durante 2 semanas.

Degradación por exposición a la radiación ultravioleta (254nm) durante 2 semanas.

Se sometieron al método todas las muestras teniendo en cada cromatoplaça una solución intacta de la sustancia de referencia, así mismo se efectuó un barrido espectrofotométrico (450-220 nm) de las muestras de la sustancia de referencia degradadas al UV y por la luz natural, preparadas en metanol a una concentración final de 20mcg/ml contra una solución de referencia a la misma concentración.

2) Exactitud

Se analizaron individualmente 15 muestras de placebo cargado a una sola concentración (10.20 mg), y siguiendo la metodología descrita con anterioridad.

Solución de referencia: se pesaron 12 mg de Nifedipina sustancia de referencia, en un matraz volumétrico...

Solución problema: se vertieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml el equivalente a tres ...

3) Precisión

Para evaluar la precisión como repetibilidad se emplearon los datos de la exactitud.

La evaluación de la precisión como reproducibilidad se efectuó con el análisis por quintuplicado apartir de muestras independientes de placebo cargado a la concentración de 100%, realizados en días diferentes por dos analistas.

4) Linealidad del Método

Para conocer la linealidad del método se evaluaron muestras de placebo cargado por quintuplicado, realizando pesadas independientes a contraciones del 70, 80, 90, 100, 105 y 110 % del valor de contenido del activo señalado en el marbete del producto (10 mg/cap), corriendo en placas diferentes cada uno de los niveles de concentración ensayados.

5) Límite de Detección

Este parámetro se evaluó aplicando en las cromatoplasas concentraciones muy pequeñas de una solución de referencia, siendo estas de 1, 5, 10, 15, 25 y 50 μ l, por triplicado y verificando la detección de las muestras al UV (254nm).

VI. RESULTADOS

A. Captopril

1. DESARROLLO DE LA TECNICA CROMATOGRAFICA

Al aplicar la técnica cromatográfica al análisis de tabletas de Captopril se logran obtener valores de $Rf \times 100$ de 88.35 para el principio activo, detectandose otra mancha con un $Rf \times 100$ de 33.54 que aparece en muestras de tabletas, de materia prima, así como en la sustancia de referencia, pero que no corresponde a alguna interferencia causada por los excipientes, como se muestra en la figura No.1; en la tabla No.1 se reportan las condiciones experimentales bajo las cuales se desarrollo el análisis cromatográfico.

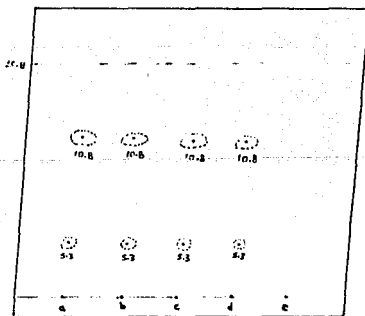


Fig. No.1 Representación de la Cromatografía para Captopril. Los puntos representan las muestras aplicadas. a) tabletas, b) Sust. Referencia. c) tabletas, d) materia prima y e) Placebo.

Tabla No.1 Reporte Cromatográfico de Captopril

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA NUMERO: UHO

NOMBRE DEL COMPUESTO: CAPTOPRIL, TABLETAS.

CONDICIONES EXPERIMENTALES

CAPA ADSORBENTE: SILICA GEL GF₂₅₄ GROSOR: 0.25 mm.

TAMANO DE LA PLACA: 20 x 20 cm. (PRECUBIERTA).

TIPO DE CÁMARA: DE VIDRIO DE 20x20x10 cm.

ESTADO DE SATURACION DE LA CÁMARA: EL ALCANZADO EN 30 min.

DISTANCIA RECORRIDA: 15.8 cm. TIEMPO DE RECORRIDO: APROX. 90min.

COMPOSICION Y VOLUMEN DEL SISTEMA DE ELUCION: _____

BENCENO: ACIDO ACETICO GLACIAL 70:30. 30 ml.

PUREZA DE DISOLVENTES EMPLEADOS: BENCENO R.A.

ACIDO ACETICO R.A.

HUESTRA(S) ANALIZADA(S): ESTANDAR. MATERIA PRIMA.

TABLETAS A GRANUL. PLACEBO.

TIPO DE ESTANDAR(ES) EMPLEADO(S): ESTANDAR SECUNDARIO DE REFERENCIA DE CAPTOPRIL.

CONCENTRACION Y VOLUMEN DE LAS HUESTRAS APLICADAS: SOLUCIONES A UNA CONCENTRACION DE 10mg/ml EN ETANOL: AGUA(1:1). 25µl DE C/U.

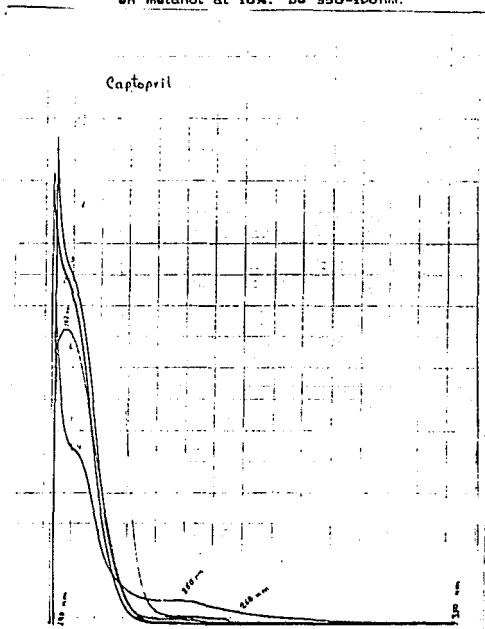
MARGEN DEL PUNTO DE APLICACION A LA BASE DE LA PLACA: 2.0 cm.

DETECCION: CON VAPORES DE IODO.

OBSERVACIONES: SE DETECTAN 2 MANCHAS EN LAS HUESTRAS DE ESTANDAR, MATERIA PRIMA Y TABLETAS, CON VALORES DE Rf x 100 DE 68.35 PARA LA PRINCIPAL Y DE 33.54 PARA LA SECUNDARIA, LA MAS PEQUENA.

Se efectuó la valoración química de la muestra obtenida en el raspado y extracción del activo, de manera directa, es decir sin mediar reacción química, para lo cual se realizó un barrido espectrofotométrico, obteniéndose un máximo de absorción para la solución de referencia de 197nm (a una concentración de 10 µg/ml en solución metanólica al 10%), como se observa en la gráfica No.1., por lo que se descartó esta opción.

Gráfica No.1 Barrido Espectrofotométrico de Captopril en metanol al 10%. De 250-190nm.



1. Sust. Ref., 2. materia prima, 3. tabletas
y 4. tabletas degradadas en medio alcalino

2. VALIDACION DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

1. Resultados de Especificidad para Captopril

Las respuestas encontradas tras la evaluación cromatográfica de las muestras degradadas e intactas se reportan en la tabla No.2 mediante los valores de Rf x100.

Tabla No.2 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE ESPECIFICIDAD PARA CAPTOPRIL

	VALORES DE Rf x100						
	INTACTO		DEGRAD. ACIDA	DEGRAD. ALCALINA	H ₂ O ₂	DEGRAD. LUZ	UV
SUSTANCIA DE REFERENCIA (Sust.Ref.)	68.15	64.85	84.52	37.58	13.38	68.15	68.32
	32.90	33.76	56.77 49.68 30.32	10.19	10.19	33.90	61.49 33.54
PLACEBO CARGADO (P.C.)	68.15		85.16	36.94	12.74	68.15	68.32
	33.76		56.77 48.39 29.03	10.19	10.19	33.76	61.49 33.54
TABLETAS (TAB.)	68.39		84.52	36.94	12.74	68.39	68.32
	32.90		56.13 48.69 29.03	10.19	10.19	32.90	61.49 33.54
PLACEBO (P.)	-----		-----	-----	-----	-----	-----

Los resultados anteriores se representan en las figuras No.2, 3, 4, 5 y 6, pudiendose apreciar el tamaño de las manchas al ser reveladas las cromatoplacas.

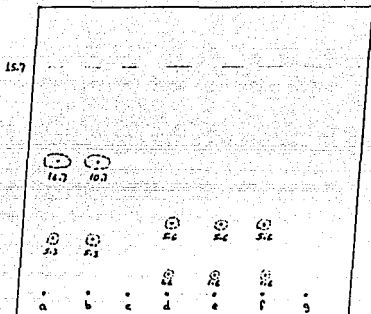


Fig. No. 2 Cromatograma 1. Evaluación de la Especificidad para Captopril. a) Sust. Ref. Int. b) PC. Int. c) P. Int. d) Sust. Ref. deg. e) PC. deg. f) Tab. deg. y g) P. deg. (degradación alcalina).

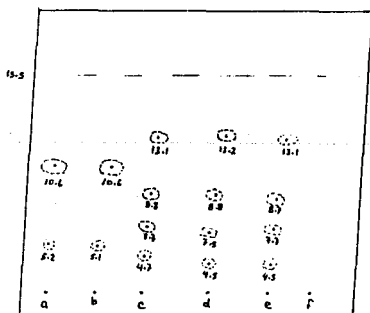


Fig. No. 3 Cromatograma 2. Evaluación de la Especificidad para Captopril. a) Sust. Ref. Int. b) Tab. Int. c) Sust. Ref. deg. d) PC. deg. e) Tab. deg y f) P. deg. (degradación alcalina).

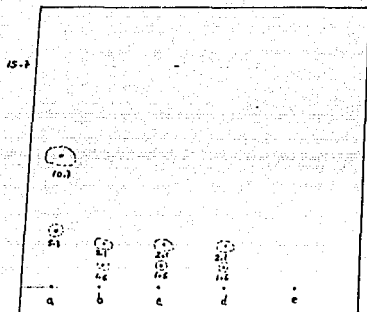


Fig. No. 4 Cromatograma 3. Evaluación de la Especificidad para Captopril. a) Sust. Ref. Int. b) Sust. Ref. deg. c) PC. deg. d) Tab. deg. y e) P. deg. (degradación en H_2O_2).

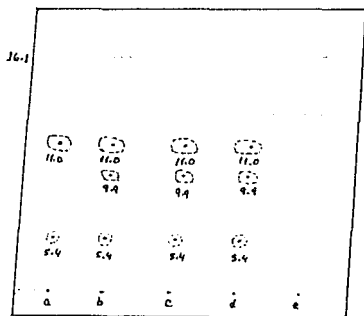


Fig. No. 5 Cromatograma 4. Evaluación de la Especificidad para Captopril. a) Sust. Ref. Int. b) Sust. Ref. deg. c) PC. deg. d) Tab. deg. y e) P. deg. (degradación al UV).

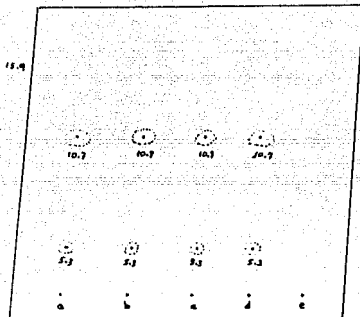


Fig. No. 6 Cromatograma 5. Evaluación de la Especificidad para Captopril. a) Sust. Ref. Int. b) Sust. Ref. deg. c) PC. deg. d) Tab. deg. y e) P. deg. (degradación a la luz).

Para evaluar la especificidad del método para pruebas de estabilidad, se sometieron durante tres meses a condiciones de temperatura y humedad a muestras de tabletas de Captopril, determinando aspecto, friabilidad, dureza, contenido de humedad, tiempo de desintegración, peso promedio y herméticidad y la cromatografía para detectar posibles productos de degradación, los resultados se muestran en las siguientes tablas, tabla No. 3 (temperatura ambiente), No. 4 (37°C y 70% de humedad relativa), la No. 5 (45°C), y en la No. 6 (60°C), en las que se comparan los resultados iniciales con los obtenidos en el estudio.

Tabla No.3 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE ESPECIFICIDAD PARA
 TABLETAS DE CAPIOFRIL A TEMPERATURA AMBIENTE

Especificaciones	Temperatura Ambiente			
	Inicial	mes 1	2	3
Aspecto: tabletas uniformes, de color ligeramente crema.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Friabilidad: No más de 0.8%	0.31%	0.40%	0.24%	0.30%
Dureza: No menos de 3 Kg	7.4 Kg	7.9 Kg	7.9 Kg	7.7 Kg
Humedad: No más del 2%	0.99%	0.99%	0.96%	1.00%
Tiempo de desintegración: No mas de 30 min.	3 min	3 min	3 min	3 min
Peso promedio: 120 mg	119.0 mg	117.5 mg	117.5 mg	117.6 mg
Valoración: 25 mg/tab	23.41 mg	23.39 mg	23.34 mg	23.29 mg
90% - 110%	93.64%	93.56%	93.36%	93.16%
C.C.F. como el estándar	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Hermeticidad: Hermético	Hermético	Hermético	Hermético	Hermético

Tabla No.4 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE ESPECIFICIDAD PARA
 TABLETAS DE CAPIOPRIL A 37° C Y 70% DE H.R.

Especificaciones	Inicial	37° C y 70% de H.R.		
		mes 1	2	3
Aspecto: tabletas uniformes, de color ligeramente crema.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Friabilidad: No más de 0.6%	0.31%	0.34%	0.24%	0.20%
Dureza: No menos de 3 kg	7.4 kg	7.5 kg	7.5 Kg	7.8 Kg
Humedad: No más del 2%	0.99%	0.86%	0.76%	0.55%
Tiempo de desintegración: No más de 30 min.	3 min	3 min	3 min	3 min
Peso promedio: 120 mg	119.0 mg	117.1 mg	117.1 mg	117.2 mg
Valoración: 25 mg/tab 90% - 110%	23.41 mg 93.64%	23.12 mg 92.48%	22.86 mg 91.44%	22.75 mg 91.00%
C.C.F. como el estándar	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Hermeticidad: Hermético	Hermético	Hermético	Hermético	Hermético

Tabla No.5 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE ESPECIFICIDAD PARA
TABLETAS DE CAPTOPRIL A 45°C DE TEMPERATURA

Especificaciones	Inicial	45°C		
		mes 1	2	3
Aspecto: tabletas uniformes, de color ligeramente crena.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Friabilidad: No más de 0.8%	0.31%	0.16%	0.15%	0.13%
Dureza: No menos de 3 kg	7.4 kg	7.2 Kg	7.4 Kg	7.4 Kg
Humedad: No más del 2%	0.99%	0.67%	0.66%	0.37%
Tiempo de desintegración: No mas de 30 min.	3 min	3 min	3 min	4 min
Peso promedio: 120 mg	119.0 mg	118.0 mg	116.5 mg	115.7 mg
Valoración: 25 mg/tab 90% - 110%	23.41 mg 93.64%	23.12 mg 92.48%	22.8 mg 91.2%	21.99 mg 87.96%
C.C.F. como el estándar	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Hermeticidad: Hermético	Hermético	Hermético	Hermético	Hermético

Tabla No.6 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE LA ESPECIFICIDAD PARA
TABLETAS DE CAPTOPRIL A 60°C DE TEMPERATURA

Especificaciones	60°C			
	Inicial	mes 1	2	3
Aspecto: tabletas uniformes, de color ligeramente crema.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Friabilidad: No más de 0.8%	0.31%	0.09%	0.06%	0.05%
Dureza: No menos de 3 Kg	7.4 Kg	7.4 Kg	7.6 Kg	7.6 Kg
Humedad: No más del 2%	0.99%	0.66%	0.56%	0.35%
Tiempo de desintegración: No mas de 30 min.	3 min	4 min	4 min	4 min
Peso promedio: 120 mg	119.0 mg	116.5 mg	118.0 mg	116.1 mg
Valoración: 25 mg/tab 90% - 110%	23.41 mg 93.64%	22.91 mg 91.64%	22.45 mg 89.96%	21.98 mg 87.92%
C.C.F. como el estándar	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Hermeticidad: Hermético	Hermético	Hermético	Hermético	Hermético

B. Nifedipina

1. DESARROLLO DE LA TECNICA CROMATOGRAFICA

Los resultados obtenidos en el desarrollo de la técnica cromatográfica para las cápsulas de gelatina blanda de Nifedipina fueron buenos, como se muestra en la figura No.7, que es la representación del cromatograma resultante al evaluar una solución de referencia y dos probemas, en la tabla No.7 se resumen las condiciones bajo las cuales se desarrollo la técnica.

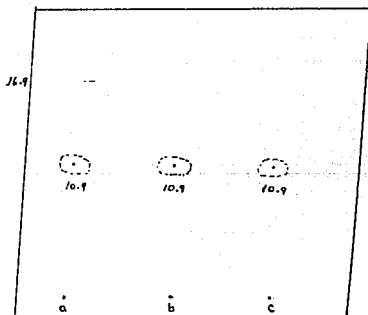


Fig. No. 7. Representación del cromatograma de Nifedipina a) sust. Ref. b) y c) muestras de sol. problema.

Tabla No.7 Reporte Cromatográfico de Nifedipina

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA NUMERO: DOS

NOMBRE DEL COMPUESTO: NIFEDIPINA. CAPSULAS DE GELATINA BLANDA.

CONDICIONES EXPERIMENTALES

CAPA ADSORBENTE: SILICA GEL GF₂₅₄ GROSOR: 0.25 mm.

TAMANO DE LA PLACA: 20 x20 cm. (PRECUBIERTAS).

TIPO DE CAMARA: DE VIDRIO DE 20x20x10 cm.

ESTADO DE SATURACION DE LA CAMARA: EL ALCANZADO EN 30 min.

DISTANCIA RECORRIDA: 16.9 cm. TIEMPO DE RECORRIDO: APROX. 45min.

COMPOSICION Y VOLUMEN DEL SISTEMA DE ELUCION: ACETATO DE ETILO:

TRACLORURO DE CARBONO:HIDROXIDO DE AMONIO(20%), 80:60:1, 60ml.

PUREZA DE DISOLVENTES EMPLEADOS: ACETATO DE ETILO R.A.

HIDROXIDO DE AMONIO R.A. TETRACLORURO DE CARBONO R.A.

MUESTRA(S) ANALIZADA(S): ESTANDAR.

CAPSULAS A GRANUL

TIPO DE ESTANDAR(S) EMPLEADO(S): ESTANDAR SECUNDARIO DE REFERENCIA DE NIFEDIPINA.

CONCENTRACION Y VOLUMEN DE LAS MUESTRAS APLICADAS: SOLUCIONES A UNA CONCENTRACION DE 1.2mg/ml EN HCl₂-MeOH, 250µl DE CADA UNA.

MARGEN DEL PUNTO DE APLICACION A LA BASE DE LA PLACA: 2.0 cm.

DETECCION: AL ULTRAVIOLETA (254nm).

OBSERVACIONES: APARECE UNA SOLA MANCHA CORRESPONDIENTE AL ACTIVO EN CADA UNA DE LAS MUESTRAS REVELADAS EN EL CROMATOGRAMA, CON UN VALOR DE Rf x100 DE 64.5.

2. VALIDACION DE LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

a. Resultados de Especificidad. Al evaluar la especificidad del método se emplearon muestras intactas de la sustancia de referencia, placebo cargado y placebo, así como muestras degradadas de los mismos, reportándose los resultados en la tabla No.8 con valores de $R_f \times 100$, obtenidos al revelar los cromatogramas, así mismo estos se representan esquemáticamente en las figuras No.8, 9 y 10.

Tabla No.8 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE ESPECIFICIDAD PARA NIFEDIPINA

VALORES DE $R_f \times 100$						
	INTACTO	DEGRAD. ACIDA	DEGRAD. ALCALINA	H ₂ O ₂	DEGRAD. LUZ	UV
SUSTANCIA DE REFERENCIA (Sust.Ref.)	64.50	88.48 38.79	86.39 80.47 37.87 12.42	83.43 73.96	84.24 76.79 68.48 43.64	89.09 82.42 73.24 41.82
PLÁCEBO CARGADO (PC.)	64.50	88.48 38.79	86.39 80.47 38.46 12.42	83.43 3.969	84.24 76.79 68.48 43.64	89.70 82.42 73.33 41.82
PLÁCEBO (P.)	-----	-----	-----	-----	-----	-----

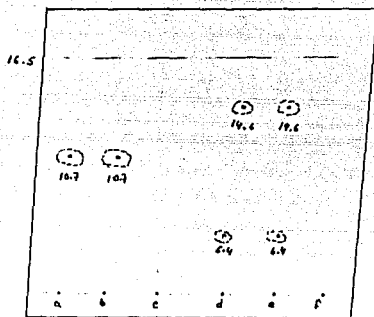


Fig. No. 8 Evaluación de la Especificidad para cap. gel. b. de Nifedipina. a) Sust. Ref. Int. b) PC. Int. c) PC. Int. d) Sust. Ref. deg. e) PC. deg. y f) P. deg. (deg. acida).

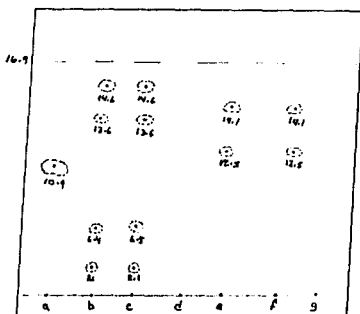


Fig. No. 9 Evaluación de la Especificidad para cap. gel. b. de Nifedipina. a) Sust. Ref. Int. b) Sust. Ref. deg. c) PC. deg. y. dr. deg. (deg. alcalina); e) Sust. Ref. deg. f) PC. deg. y g) P. deg. (deg. con H_2O_2).

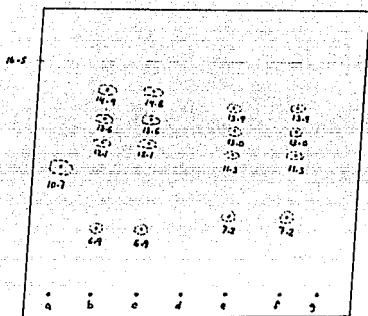
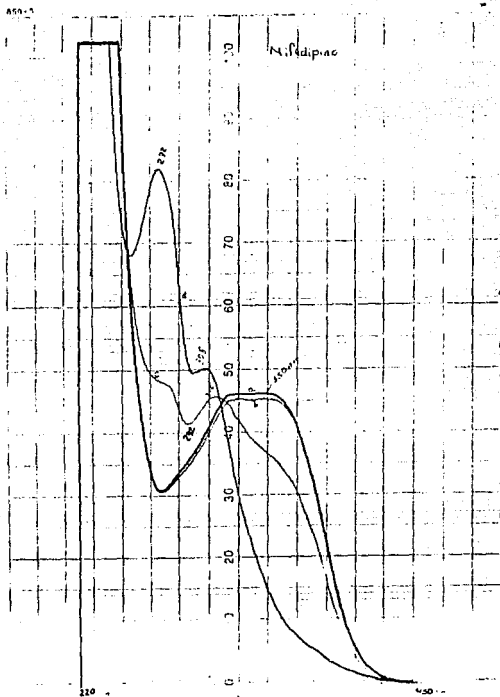


Fig. No. 10 Evaluación de la Especificidad para cap. gel. b de Nifedipina. a) Sust. Ref. Int. b) Sust. Ref. deg. c) Pc. deg y d) P. deg. (deg. al UV); e) Sust. Ref. deg. f) PC) deg. y g) P. deg. (deg. con luz).

Cuando se realiza la valoración de las muestras los productos de degradación detectados no interfieren, ya que tienen diferentes valores de Rf, esto se verificó realizando un barrido espectrofotométrico (450-220nm) con muestras degradadas a la luz y al UV como se observa en la gráfica No. 2.

Debido a que el método se desarrollo para ser empleado en pruebas de estabilidad, se sometieron durante tres meses muestras de dos lotes de Nifedipina, cápsulas de gelatina blanda, a condiciones de temperatura y humedad, evaluando cada mes los parametros que se reportan en las tablas No. 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

Gráfica No. 2 Barrido Espectrofotométrico de Nifedipina
De 450-220nm.



a) Sust. Ref. b) materia prima. c) nitro-derivado y
d) nitro-derivado, a una concentración de
20 mcg/ml en metanol.

Tabla No.9 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE ESPECIFICACIONES PARA LAS CAPSULAS DE NIFEDIPINA A TEMPERATURA AMBIENTE "LOTE A"

Especificaciones	Inicial	Temperatura		Ambiente
		Mes 1	2	
Aspecto: cefopolid con 10 capsulas oblongas del N° brillantes de color rojo.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Olor: ligeramente a menta.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
pH de la solución: 5.0-8.0	7.25	7.25	7.28	7.34
Tiempo de desintegración: No más de 30 min.	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.
Peso promedio: 700 mg.	676.4 mg	676.6 mg	677.3 mg	674.8 mg
Densidad de la solución: 1.13 - 1.15 g/ml	1.140g/ml	1.140g/ml	1.141g/ml	1.143g/ml
Contenido de Humedad de la solución: No más del 12%	10.76%	10.72%	10.69%	10.65%
Valoración: 10 mg/cap. 90% - 110%	9.95mg 99.5%	9.91mg 99.1%	9.89mg 98.9%	9.86mg 98.6%
C.C.F.: Sin productos de degradación.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Hermeticidad: Hermético.	Hermético	Hermético	Hermético	Hermético

Tabla No.10 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE ESPECIFICIDAD PARA LAS CAPSULAS DE NIFEDIPINA A 30 C DE TEMPERATURA

Especificaciones	30° C			
	Inicial	Nes 1	2	3
Aspecto: colorial con 10 capsulas oblongas del no brillantes de color rojo.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Olor: ligeramente a menta.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
pH de la solución: 5.0-8.0	7.25	7.23	7.41	7.38
Tiempo de desintegración: No más de 30 min.	5 min.	5 min.	5 min.	6 min.
Peso promedio: 700 mg.	678.4 mg	674.5 mg	677.4 mg	668.9 mg
Densidad de la solución: 1.13 - 1.15 g/ml	1.140g/ml	1.142g/ml	1.144g/ml	1.144g/ml
Contenido de Humedad de la solución: No más del 12%	10.70%	9.16%	8.54%	6.99%
Valoración: 10 mg/cap. 90% - 110%	9.95mg 99.5%	9.92mg 99.2%	9.81mg 98.1%	9.81mg 98.1%
C.C.F.: Sin productos de degradación.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Hermeticidad: Hermético.	Hermético	Hermético	Hermético	Hermético

Tabla No.11 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE ESPECIFICIDAD PARA LAS CAPSULAS DE NIFEDIPINA A 37 C Y 70% DE H.R. "Lote A"

Especificaciones	Inicial	37° C y 70% de H. R.		
		1	2	3
Aspecto: celopolial con 10 capsulas oblongas del N8 brillantes de color rojo.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Olor: ligeramente a menta.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
pH de la solución: 5.0-8.0	7.25	7.28	7.32	7.24
Tiempo de desintegración: No más de 30 min.	5 min.	6 min.	6 min.	6 min.
Peso promedio: 700 mg.	678.4 mg	675.9 mg	674.9 mg	668.7 mg
Densidad de la solución: 1.13 - 1.15 g/ml	1.140g/ml	1.142g/ml	1.141g/ml	1.145g/ml
Contenido de Humedad de la solución: No más del 12%.	10.78%	9.54%	5.14%	4.96%
Valoración: 10 mg/cap. 90% - 110%	9.95mg 99.5%	9.96mg 99.6%	9.77mg 97.7%	9.66mg 96.6%
C.C.F.: Sin productos de degradación.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Hermeticidad: Hermético.	Hermético	Hermético	Hermético	Hermético

Tabla No.12 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE ESPECIFICIDAD PARA LAS CAPSULAS DE NIFEDIPIRA A TEMPERATURA AMBIENTE "Lote B"

Especificaciones	Inicial	Temperatura Ambiente		
		Mes 1	2	3
Aspecto: celopoliial con 10 capsulas oblongas del #8 brillantes de color rojo.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Olor: ligeramente a nenta.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
pH de la solución: 5.0-8.0	7.23	7.26	7.35	7.28
Tiempo de desintegración: No más de 30 min.	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.
Peso promedio: 700 mg.	676.6 mg	674.9 mg	673.4 mg	675.6 mg
Densidad de la solución: 1.13 - 1.15 g/ml	1.140g/ml	1.140g/ml	1.145 g/ml	1.146g/ml
Contenido de Humedad de la solución: No más del 12%	10.75%	10.55%	10.51%	10.47%
Valoración: 10 mg/cap. 90% - 110%	9.86mg 98.6%	9.84mg 98.4%	9.77mg 97.9%	9.77mg 97.7%
C.C.F.: Sin productos de degradación.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Hermeticidad: Hermético.	Hermético	Hermético	Hermético	Hermético

Tabla No.13 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE ESPECIFICIDAD PARA LAS CAPSULAS DE NIFEDIPINA A 30 C DE TEMPERATURA "Lote B"

Especificaciones	Inicial	30° C		
		Mes 1	2	3
Aspecto: colopial con 10 capsulas oblongas del #8 brillantes de color rojo.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Olor: ligeramente a menta.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
pH de la solución: 5.0-8.0	7.23	7.42	7.50	7.34
Tiempo de desintegración: No más de 30 min.	5 min.	5 min.	5 min.	6 min.
Peso promedio: 700 mg.	676.6 mg	672.8 mg	668.9 mg	662.3 mg
Densidad de la solución: 1.13 - 1.15 g/ml	1.140g/ml	1.144g/ml	1.146g/ml	1.144g/ml
Contenido de Humedad de la solución: No más del 12%	10.75%	8.73%	7.14%	6.94%
Valoración: 10 mg/cap. 90% - 110%	9.66mg 98.6%	9.81mg 98.1%	9.77mg 97.7%	9.72mg 97.2%
C.C.F.: Sin productos de degradación.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Hermeticidad: Hermético.	Hermético	Hermético	Hermético	Hermético

Tabla No.14 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE ESPECIFICIDAD PARA LAS
CAPSULAS DE NIFEDIPINA A 37 C Y 70% DE H.R. "Lote B"

Especificaciones	Inicial	37° C y 70% de H. R.		
		Mes 1	2	3
Aspecto: celopial con 10 capsulas oblongas del #8 brillantes de color rojo.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Olor: ligeramente a menta.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
pH de la solución: 5.0-8.0	7.23	7.25	7.15	7.00
Tiempo de desintegración: No más de 30 min.	5 min.	6 min.	6 min.	6 min.
Peso promedio: 700 mg.	676.6 mg	674.9 mg	651.4 mg	647.7 mg
Densidad de la solución: 1.13 - 1.15 g/ml	1.140g/ml	1.144g/ml	1.141g/ml	1.147g/ml
Contenido de Humedad de la solución: No más del 12%	10.75%	8.69%	4.02%	4.65%
Valoración: 10 mg/cap. 90% - 110%	9.86mg 98.6%	9.76mg 97.6%	9.67mg 96.7%	9.58mg 95.8%
C.C.F.: Sin productos de degradación.	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Hermeticidad: Hermético.	Hermético	Hermético	Hermético	Hermético

b. Resultados de Exactitud para Nifedipina. Los resultados de la evaluación de este parámetro se muestran a continuación:

	mg agregados	mg recuperados	Abs.	% recobro
1.	10.20	10.252	0.326	100.51
2.	10.20	10.189	0.324	99.89
3.	10.20	10.189	0.324	99.89
4.	10.20	10.126	0.322	99.28
5.	10.20	10.032	0.319	98.35
6.	10.20	10.221	0.325	100.20
7.	10.20	10.252	0.326	100.51
8.	10.20	10.095	0.321	98.97
9.	10.20	10.158	0.323	99.58
10.	10.20	10.221	0.325	100.20
11.	10.20	10.189	0.324	99.89
12.	10.20	10.126	0.322	99.28
13.	10.20	10.221	0.325	100.20
14.	10.20	10.158	0.323	99.58
15.	10.20	10.126	0.322	99.28

Evaluación.

Porcentaje de recobro:

$$\bar{x}_n = 99.71 \quad \text{máx.} = 100.51 \%$$

$$s = 0.60256 \quad \text{mín.} = 98.35 \%$$

Coefficiente de Variación:

CV = 0.6043 que es menor al 2%.

Prueba estadística t de student.

$$H_0 \quad \mu = 100 \%$$

$$H_a \quad \mu \neq 100 \%$$

$$t_{exp} = \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}} = \frac{99.71 - 100}{0.60256 / \sqrt{15}} = -1.864$$

-Área de aceptación:

$-2.1448 \leq -1.864 \leq 2.1448$, se acepta H_0 , por lo tanto se dice que el Método posee una media de porcentaje de recobro (\bar{x}_n) equivalente al 100 %.

-Intervalo de Confianza:

$$99.38 < 99.71 < 100.04$$

c. Resultados de Precisión.

repetibilidad

Porcentaje de Recobro y Coeficiente de Variación.

$$98.35\% - 100.51\%$$

$$CV = 0.6043$$

Con la prueba estadística χ^2_i

$$\sigma = 0.5821$$

$$s^2 = 0.3631$$

$$\sigma^2 = 0.3389$$

$$H_0 \quad \sigma^2 \leq 2\%$$

$$H_a \quad \sigma^2 > 2\%$$

$$\chi^2_{\text{exp}} = \frac{(n-1) * s^2}{\sigma^2} = \frac{(15-1) * 0.3631}{0.3389} = 14.9997 = 15.0$$

-Área de Aceptación:

$$15.0 \leq 26.119$$

Se acepta H_0 , se puede decir que el Método reporta datos con variación menor o igual al 2%.

Intervalo de Confianza:

$$0.4412 < 0.5821 < 0.9503$$

Reproducibilidad

Evaluated estadísticamente mediante el análisis de varianza, (ver anexo 1). Los datos se obtuvieron de dos analistas con cinco repeticiones cada uno en dos diferentes días.

		DIA 1		DIA 2	
		% RECOBRO		% RECOBRO	
		99.29		99.85	
A		98.67		100.78	Y _i
N	1	100.23		100.16	996.03
A		100.85		98.92	
L		97.74	Σ=496.78	99.54	Σ=499.25

I		98.01		98.73	
S		99.26		99.35	Y _i
T	2	100.50		100.60	994.91
A		99.88		99.66	
		99.26	Σ=496.91	99.66	Σ=498.0

		Y _j 993.69		Y _j 997.25	1990.94
a=2	b=2	c=5			

Tabla de Análisis de Varianza CANADEVAD

Fuente de variación	grados de libertad	Suma de Cuadrados SC	Media de Cuadrados	F _{exp}	F _{tab}
Analista	1	0.07	0.07	0.8159	161.4
A (2)					
Días	1	0.64	0.64	7.4592	161.4
D (2)					
Interacción	1	0.0858	0.0858	0.1037	4.49
A-D					
Error	16	13.24	0.8275	-----	-----
α=0.05					

Cálculos:

$$\frac{\sum Y_{bc}^2}{bc} = \frac{Y_{bc}^2 + Y_{bc}^2}{bc} = \frac{(996.03)^2 + (994.91)^2}{2 \times 5} = 198192.17$$

$$\frac{Y_{abc}^2}{abc} = \frac{(1990.94)^2}{2 \times 5 \times 2} = 198192.1$$

$$\frac{\sum Y_{ac}^2}{ac} = \frac{(993.69)^2 + (997.25)^2}{2 \times 5} = 198192.74$$

$$\frac{\sum Y_{cjk}^2}{c} = \frac{(496.78)^2 + (499.25)^2 + (496.91)^2 + (498.0)^2}{5} = 198192.9$$

$$\sum Y_{ijk}^2 = (99.29)^2 + (98.67)^2 + (99.85)^2 + \dots + (99.66)^2 = 198206.14$$

$$F_{exp_A} = \frac{MCA}{MCA_D} = \frac{0.07}{0.0858} = 0.8159$$

$$F_{exp_D} = \frac{MCD}{MCA_D} = \frac{0.64}{0.0858} = 7.4592$$

$$F_{exp_{AD}} = \frac{MCA_D}{MCA_D} = \frac{0.0858}{0.8275} = 0.1037$$

Evaluación de los Factores de Variación

-Analista (A)

Area de aceptación: $F_{exp_A} < F_{0.05_A} = 0.8159 < 161.4$

-Día (D)

Area de aceptación: $F_{exp_D} < F_{0.05_D} = 7.4592 < 161.4$

-Interacción Analista-Día (A-D)

Area de aceptación: $F_{exp_{AD}} < F_{0.05_{AD}} = 0.1037 < 4.49$

Por lo tanto se observa que no existe efecto significativo en analista, día e interacción analista-día, lo que indica que el método es reproducible y por lo tanto preciso.

c. Resultados de Linearidad. Los resultados obtenidos durante la evaluación de este parámetro son los siguientes:

mg adicionados	mg recuperados	% recobro
x	y	
7.07	7.049	99.70
7.07	6.986	98.81
7.07	7.049	99.70
7.07	6.923	97.92
7.07	7.112	100.59
8.04	7.898	98.24
8.04	7.993	99.41
8.04	7.961	99.02
8.04	7.898	98.24
8.04	7.835	97.45
9.12	8.937	97.99
9.12	8.968	98.34
9.12	9.063	99.37
9.12	9.157	100.41
9.12	9.063	99.37
10.08	9.975	98.96
10.08	10.069	99.90
10.08	10.132	100.52
10.08	9.912	98.34
10.08	10.038	99.58
10.53	10.510	99.81
10.53	10.384	98.62
10.53	10.667	101.30
10.53	10.290	97.72
10.53	10.353	98.32
11.03	10.730	97.28
11.03	10.730	97.28
11.03	10.951	99.28
11.03	11.045	100.14
11.03	10.825	98.14

Evaluación

Mediante el % de Recobro y CV a cada nivel y el total.

nivel al 70%	x=99.34	s=1.0148	CV=1.0215
nivel al 80%	x=98.47	s=0.7636	CV=0.7755
nivel al 90%	x=99.10	s=0.9581	CV=0.9668
nivel al 100%	x=99.46	s=0.8420	CV=0.8466
nivel al 105%	x=99.15	s=1.4206	CV=1.4328
nivel al 110%	x=98.42	s=1.2625	CV=1.2828

x total = 98.99 s total = 1.0549
CV total = 1.0657

Mediante una Correlación lineal

$\bar{x} = 9.312$	$\bar{y} = 9.212$
$\sigma = 1.397$	$\sigma = 1.380$
$\sigma = 1.421$	$s = 1.403$
$\Sigma x = 279.350$	$\Sigma y = 276.503$
$\Sigma x^2 = 2659.746$	$\Sigma y^2 = 2605.577$
$\Sigma xy = 2632.3669$	

Sometiendo los datos a una regresión lineal se obtiene:
coeficiente de correlación $r = 0.997324$
ordenada al origen $a = 0.0432308$
pendiente $m = 0.9851658$

Ecuación que representa al Método:

$$y = 0.04323 + 0.9852x - 0.006$$

cálculo del Error Experimental:

$$E_{ij} = \Sigma (y_i - \hat{y}_i) = -0.006 = 6 \times 10^{-3}$$

Cálculo del Error típico de estimación:

$$\hat{s}_{y/x} = \sqrt{\frac{2605.557 - 0.0432308(276.503) - 0.9851658(2632.3669)}{30 - 2}} = 0.1045$$

Evaluación de la Pendiente (b), con t de student.

$$H_0 \quad B_0 = 1$$

$$H_a \quad B_0 \neq 1$$

$$t_{exp} = \frac{(b - B_0) s_x \sqrt{n-1}}{\hat{s}_{y/x}} = \frac{(0.9851658 - 1.00) 1.421 \sqrt{30-1}}{0.1045}$$

$$t_{exp} = -1.0863$$

Area de aceptación:

$$-2.0484 \leq -1.0863 \leq 2.0484$$

Por lo tanto se acepta H_0 , y se dice que el Método posee una pendiente (b) considerada como 1.

Evaluación de la Ordenada al Origen (a), con t de student.

$$H_0 \quad A_0 = 0$$

$$H_a \quad A_0 \neq 0$$

$$t_{exp} = \frac{a - A_0}{\hat{s}_{y/x} \sqrt{\sum x_i^2 / n (\sum (x_i - \bar{x})^2)}} = \frac{0.0432308 - 0.000}{0.1045 \sqrt{2659.746 / 30(58.5314)}}$$

$$t_{exp} = 0.3361$$

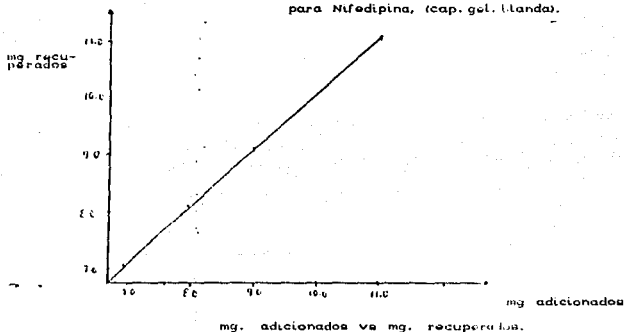
Area de aceptación:

$$-2.0484 \leq 0.3361 \leq 2.0484$$

Por lo que se acepta H_0 , lo que implica que al Método se le puede considerar con una ordenada al origen igual a cero.

Por todo lo anterior podemos decir que el Método en cuestión posee un comportamiento lineal, como se muestra en la gráfica No. 3.

Gráfica No. 3 Linealidad del Método Cromatográfico para Nifedipina, (cap. gel. blanda).



Observamos en la gráfica que en el intervalo de concentración empleado el método cromatográfico tiene un comportamiento lineal con una ordenada al origen considerada como 0 y una pendiente con valor de 1.

e. Resultados de Límite de detección. Al aplicar las muestras de la solución problema en bajas concentraciones (1.2, 6.0, 12.0, 18.0, 30.0 y 60.0 μg) y desarrollar la cromatografía de acuerdo a la técnica desarrollada se obtubieron los siguientes resultados:

mg adicionados mg recuperados % recobro

x	y	
1.2	1.2	100.0
1.2	1.1	91.6
1.2	1.2	100.0
6.0	6.1	101.67
6.0	6.1	101.67
6.0	6.0	100.0
12.0	12.0	100.0
12.0	12.1	100.83

12.0	11.9	99.17
18.0	17.9	99.44
18.0	17.9	99.44
18.0	18.1	100.56
30.0	29.7	99.0
30.0	29.9	99.67
30.0	29.8	99.33
60.0	60.1	100.17
60.0	59.7	99.5
60.0	59.9	99.83

$$\Sigma y = 380.7$$

$$r = 0.9999825$$

$$\Sigma y^2 = 14943.21$$

$$a = 0.0039917$$

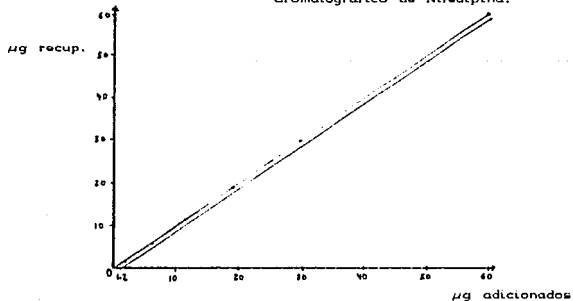
$$\Sigma xy = 14979.6$$

$$m = 0.9974532$$

$$\hat{s}_{y/x} = \sqrt{\frac{14943.21 - (0.0039917 \times 380.7) - (0.9974532 \times 14979.6)}{18-2}} = 0.1226$$

Trazando una curva paralela con un valor de 1.96×0.1226 se obtiene la gráfica No.4, donde se observa que el intercepto con el eje de la ordena es a $1.2 \mu\text{g}$ que corresponde al límite de detección.

Gráfica No.4 Límite de Detección para el Método Cromatográfico de Nifedipina.



VII DISCUSION DE RESULTADOS

A. Captopril

1. DESARROLLO DE LA TECNICA CROMATOGRAFICA

Ejecutada la técnica cromatográfica, se analizó la placa obtenida, apareciendo una mancha principal y una mancha secundaria con valores de $R_f \times 100$ de 68.35 y 33.54 respectivamente. (fig.No.1) al sublimarse el iodo de la placa, permanece impregnada la mancha secundaria indicándonos que se trata de un compuesto orgánico no saturado y que aparece tanto en la sustancia de referencia, materia prima y producto, tratándose de una impureza del fármaco, también observamos que el placebo no da respuesta por lo cual no interfiere.

Esta técnica cromatográfica permite la separación de dos sustancias presentes en el activo, con diferentes valores de R_f , cuando se efectúa bajo las condiciones señaladas en la tabla No.1.

Con respecto a la valoración química del activo no se efectuó ya que la fase estacionaria interfería de manera significativa, aunado a que la valoración de rutina para el activo es mediante la formación de un diazocompuesto poco estable.

Se realizó la valoración química del activo, de la muestra obtenida del raspado y extracción de la cromatoplaque, de manera directa, para lo cual se hizo un barrido espectrofotométrico, encontrándose un máximo a 197 nm (gráfica No.1), y debido al estrecho margen en la región del UV se descarta esta opción.

2. VALIDACION DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Como se explicaba anteriormente no se pudo realizar la cuantificación del activo una vez realizada la cromatografía, y puesto que los parámetros de una validación requieren datos de recobro, no se efectuó la validación solo se evaluó la especificidad, ya que el método se desarrollo con la finalidad de detectar la presencia de productos de degradación en tabletas de Captopril.

La tabla No.2 reporta los resultados obtenidos de las

muestras degradadas bajo diferentes condiciones, y observamos que la sustancia de referencia degradada y los placebos cargados degradados muestran similitud en las sustancias separadas (de acuerdo a los valores de Rf). Así mismo el placebo no da respuesta, aún degradado, permaneciendo en el punto de aplicación.

Al analizar los resultados, se verifica que la mancha secundaria detectada en el análisis de las muestras intactas no se observa en ninguna de las muestras degradadas, por lo que esta mancha corresponde a una impureza del activo.

Puesto que la técnica cromatográfica tiene por objeto la evaluación de la estabilidad de Captopril en tabletas, se sometieron muestras del producto a un incremento de temperatura y presencia de humedad, condiciones a las que se efectúa un estudio de estabilidad acelerada, durante tres meses, sin observarse cambios significativos en las determinaciones físico-químicas y sin la detección de productos de degradación, como se reporta en las tablas No. 3-6; en los cromatogramas solo se visualizan dos manchas que no son más intensas ni mayores a las observadas al inicio del estudio.

Por todo lo anterior, se considera que el Método Analítico, Cromatografía en Capa Fina, desarrollado para las tabletas de Captopril, es adecuado para la evaluación semicuantitativa, en un estudio de estabilidad, ya que los valores de Rf que reporta el activo son diferentes a los de los productos de degradación que se pudieran formar durante un estudio, además de no registrarse interferencia por parte de los excipientes.

B. Nifedipina

1. DESARROLLO DE LA TÉCNICA CROMATOGRAFICA

El cromatograma obtenido al ejecutar la técnica nos revela una mancha ovalada perfectamente definida con un Rf₁₀₀ de 64.5, (fig.No.7), bajo las condiciones que se especifican en la tabla No.7, y que permite la valoración química del activo, a una longitud de onda de 350 nm, de acuerdo a la metodología propuesta en la parte experimental.

2. VALIDACION DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Para poder emplear la técnica cromatográfica desarrollada en la detección de productos de degradación en estudios de estabilidad, el parametro de especificidad es de suma importancia, los resultados de la evaluación de este parametro se reportan en la tabla No.8, observamos a los principales productos de la degradación de Nifedipina (nitro y nitroso derivado), que se desplazan más en el cromatograma (valores de R_f mayores que del y muy cercanos entre sí, cuando se efectua la valoración del activo los productos de degradación no interfieren, esto se comprobo al efectuar un barrido espectrofotométrico (gráfica No.2).

Las muestras que se sometieron a degradación presentan varias manchas menores a la correspondiente del activo, que indican degradación, pero que no tienen similitud con los principales productos de degradación, como se visualiza en las figuras No.8, 9 y 10. Tampoco se observa interferencia causada por los excipientes de la formulación, solución líquida de las cápsulas de gelatina blanda, ya que el placebo no da respuesta, aun habiendose degradado.

Durante el estudio a que se sometieron muestras de dos lotes de cápsulas de gelatina blanda de Nifedipina en su material de empaque, en condiciones similares a las de un estudio de estabilidad acelerada, los resultados que obtenidos se reportan en las tablas de la No.9 a la No.14

En lo referente a las características fisico-químicas del producto no se observan alteraciones, después de tres meses, y tampoco se detectan productos de degradación.

Con los resultados mencionados la técnica es considerada como específica, ya que detecta al activo y a sus productos de degradación con valores diferentes valores de R_f .

El siguiente parametro evaluado fue la exactitud, de acuerdo al anexo 1; determinandose que el método cromatográfico posee una media de porciento de recobro equivalente al cien por ciento y un

coeficiente de variación menor al 2%, considerandose al método como Exacto.

En lo relacionado a la Precisión expresada como Repetibilidad, se reportan datos con una variación menor al 2%, siendo el método repetible. La Precisión expresada como Reproducibilidad, indica que los factores de variación no tienen efecto significativo sobre el método por lo cual se considera Preciso.

Con respecto a la linealidad se obtiene la ecuación de una recta que representa al método e indica que la pendiente puede ser considerada como 1 y la ordenada al origen como 0, por lo tanto el método tiene un comportamiento lineal (gráfica No.3).

El límite de detección permitió determinar que 1.2 μg equivalente a 1 μl de la solución de referencia, se detectan en el cromatograma, gráfica No.4.

Al evaluar los parámetros propuestos para realizar la validación de la Técnica de Cromatografía en Capa Fina, como Método Analítico para la cuantificación de Nifedipina en cápsulas de gelatina blanda, este demostró que es específico, preciso, exacto, lineal, reproducible y con un límite de detección de 1.2 μg , bajo las condiciones en que fue establecido, siendo así un método analítico que proporciona datos útiles y confiables.

Por lo que la técnica cromatográfica puede ser empleada para la evaluación de la estabilidad de Nifedipina en cápsulas de gelatina blanda, permitiendo la detección de productos de degradación, que pudieran estar presentes, y también la cuantificación del activo.

VIII. CONCLUSIONES

Con el Método Analítico desarrollado por Cromatografía en Capa fina para la cuantificación de Nifedipina en cápsulas de gelatina blanda los resultados obtenidos indican que el método es específico, preciso, exacto, lineal, reproducible y sensible.

La técnica cromatográfica permite la detección de posibles productos de degradación o de impurezas en producto y también puede ser empleado en el análisis de control rutinario.

El método cromatográfico al ser específico permite la evaluación de la estabilidad de Nifedipina en cápsulas de gelatina blanda, cuando a este producto se le someta a un estudio de estabilidad.

Se puede concluir que los objetivos planteados se cubrieron de manera general y que la Hipótesis planteada no se pudo comprobar en su totalidad, puesto por que la parte correspondiente a Captopril quedó inconclusa.

Se sugiere que en estudios posteriores se determine la estabilidad de la muestra, también se recomienda evaluar al sistema, mediante la linealidad (con una curva de calibración de concentración contra respuesta media) y a la precisión (determinada por el análisis sextuplicado de una misma solución de referencia correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema), para concluir con la validación del método analítico.

Con respecto a las tabletas de Captopril, la técnica cromatográfica desarrollada puede ser empleada como Método Indicativo de estabilidad (semicuantitativamente), ya que detecta a los productos de degradación del mismo, también puede ser empleada en el control rutinario del producto puesto que detecta impurezas del activo.

El no haber podido desarrollar un método en base a la cromatografía en capa fina que permitiera la valoración de Captopril en tabletas, para ser empleado en la evaluación de la estabilidad, fue como se indicó en su oportunidad, causado por la interferencia de los soporte cromatográficos probados.

Por lo que se recomienda en caso de retomar el desarrollo de la técnica cromatográfica la sustitución del soporte por materiales como las poliamidas que por sus características podrían no interferir en la cuantificación del activo, también sería recomendable el uso de otro tipo de reacción diferente a la formación del diazocompuesto que permita obtener un derivado colorido más estable para realizar la valoración espectrofotométrica en el rango visible.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Biollaz, J., y Brunner, H., "Anport des inhibiteurs du système rénine-angiotensine au traitement de l'hypertension-artérielle". Médecine et Hygiène, (1388), 1980, pags.2641-2645.
2. Bowman, W., y Rand, M., "Farmacología, Bases Bioquímicas y Patológicas, Aplicaciones Clínicas". 2a.ed., Interamericana, México, 1984.
3. Committee Stability "Stability Concepts", Pharmaceutical Technology, 8, (6), 1984, pags.42-48.
4. "Conclusiones de las mesas redondas sobre los requisitos mínimos para las pruebas de estabilidad para medicamentos". Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 8, (3), 1987, pags.20-24.
5. Clarke's . "Insolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and post Mortem Material". 2a.edition The Pharmaceutical Society of Great Britain, The Pharmaceutical Press, London, 1986.
6. Craig, R. y Stitzel, E., "Farmacología Médica". Interamericana, México, 1985.
7. David, B. et al, "Validación de Procesos Farmacéuticos". México, 1982.
8. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a. edición, Secretaría de Salud, México, 1988.
9. Florey, K., "Analytical Profiles of Drugs Substances". 11, Academic Press Inc., Cal. USA, 1982, pags.79-137.
10. Florey, K., "Analytical Profiles of Drugs Substances". 10, Academic Press Inc., Cal. USA, 1988, pags.222-288.
- 11 Gaxiola, V., "Cromatografía, Principios y Técnicas"., El Manual Moderno, S.A., México, 1975.

12. Giral, B., y Castañeda, P., coordinadores, "Métodos Analíticos: Validación", comité de elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaría de Salud, México, 1991.
13. Goodman, G. y Gilman, A., "The Pharmacological Basis of Therapeutics". 8a. edition, Pergamon Press, USA, 1990.
14. Goth, A., "Farmacología Médica". 11a. edición, Ediciones Doyma, España, 1984.
15. Guerra, J., "Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories". Pharmaceutical Technology, 1986, pags.74-84.
16. Klaus, D., et al, "Pharmacokinetics and metabolism of Nifedipine". Hypertension, supp. 11, 5, (4), 1983, pags.18-24.
17. Korolkovas, A., "Essential of Medicinal Chemistry". 2a. edition, John Wiley and Sons Inc., USA, 1988.
18. Hess, P., "Traitement de l'hypertension sévère par le Captopril associé à un diurétique"., Médecine et Hygiène, (1390), 1980, pags.2944-2948.
19. Mohamed, M., "Potentiometric and visual titrimetric methods for analysis of Captopril and its pharmaceutical forms". Anal. Lett., 61 (B-6), 1983, pags.45-55.
20. Musumarra, G. et al, "Qualitative organic analysis identification of drugs by principal components analysis of standardized thin-layer chromatographic data in flour eluent systems". J. Chromatogr., 350, 1985, pags.151-168.
21. Patel, R., "A rapid colorimetric method for the estimation of Nifedipine". Indian J. Pharm. Sci., 46 (3), 1986, pags.126-128.
22. "Proyecto de Norma Técnica sobre los Requisitos Mínimos para las Pruebas de Estabilidad para Medicamentos y Materia Prima". Anteproyecto elaborado por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., México, 1991, revisado preliminarmente por la Secretaría de Salud.
23. Remington, "Farmacia"., 17a edición, Medica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1990.
24. Sbarbati de N., "Estabilidad de Medicamentos". Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 1975.

25. Skoo'g, D. y West, D., "Análisis Instrumental". Interamericana, México, 1982.
26. Stahal, E., "Thin Layer Chromatography". New York, USA, 1969.
27. The United States Pharmacopeia XXII, The National Formulary XVII, United States Pharmacopeial convention Inc., USA, 1990.
28. The United States Pharmacopeia XXI, supplement No.7, United States Pharmacopeial convention Inc., USA, 1988.
29. The United States Pharmacopeia XXII, supplement No.1, United States Pharmacopeial convention Inc., USA, 1990. pag. 2187.
30. The United States Pharmacopeia XXII, supplement No.4, United States Pharmacopeial convention Inc., USA, 1991. pag. 2453.
31. Timmins, P., et al, "Factors affecting Captopril stability in aqueous solution"., Int. Journal of Pharmaceutics., 11, 1982, pags.329-336.
32. Touchstone, C. and Dobbins, F., "Practice of Thin Layer Chromatography". 2a. edition, John Wiley and sons Inc., USA, 1983.
33. USP DI, "Drug Information for the Health Care Professional". IA, -11th edition, US Pharmacopeial convention Inc., USA, 1991.
34. Zhang, D., "Identification of Nifedipine and its analogs". Yiqua Gongye. ,18 (6), 1987, pags.226-227.

ANEXO 1

FORMULARIO DE VALIDACION

PARAMETROS EVALUADOS EN LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO

1. EXACTITUD

1.1 Evaluación

1.1.1 Mediante el Porcentaje de Recobro (% Rec.)

$$\text{Cálculo del \% Rec.} = \frac{\text{mg recuperados}}{\text{mg adicionados}} \times 100$$

Debe estar comprendido entre el 98% y el 102%.

1.2.1 Mediante el Coeficiente de Variación (CV)

$$\text{Cálculo del CV} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Este debe ser menor o igual al 2%.

donde:

$$s = \text{desviación estandar de los datos de \% Rec.}, \quad s = \sqrt{\frac{\sum (xi - \bar{x})^2}{n-1}}$$

\bar{x} = media del % Rec.

$$\bar{x} = \frac{\sum xi}{n}$$

n = número de ensayos

1.2.3 Mediante la Prueba Estadística t de Student.

1.2.3.1 Contraste de Hipótesis

$$H_0 \quad \mu = 100\%$$

$$H_a \quad \mu \neq 100\%$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

donde:

μ = media poblacional con un valor de cálculo del 100%

H_0 = hipótesis nula

H_a = hipótesis alterna

Area de Aceptación

$t_{\text{tab } \alpha/2} \leq t_{\text{exp}} \leq t_{\text{tab } 1-\alpha/2}$ Si se cumple esta expresión se acepta H_0 .

donde:

α = nivel de significación de 0.05

$t_{\text{tab}} = t_{0.975}$ (valores en el anexo 2)

gl = grados de libertad = $n-1$

Intervalo de Confianza

$$\bar{x}_N - t_{1-\alpha/2} * s / \sqrt{n} < \bar{x}_N < \bar{x}_N + t_{1-\alpha/2} * s / \sqrt{n}$$

2. PRECISION

2.1 Evaluación

2.1.1 Repetibilidad

2.1.2 Mediante % Rec. que debe estar comprendido entre el 98% y 102%.

2.1.3 Mediante CV el cual debe ser menor o igual al 2%.

2.1.4 Mediante la prueba estadística ji cuadrada
Contraste de Hipótesis

$H_0 \sigma \leq 2\%$

$H_a \sigma > 2\%$

$$X_{i \text{ exp}}^2 = \frac{(n-1) * s^2}{\sigma^2} \quad \text{donde:}$$

σ^2 = desviación estandar poblacional al cuadrado

s^2 = varianza de los datos de % Rec.

Area de Aceptación

$X_{i \text{ exp}}^2 \leq X_{i \text{ tab}}^2$ $X_{i \text{ tab}}^2 = X_{1-\alpha/2}^2$ $X_{0.975}^2$; si se cumple lo anterior se acepta H_0 .

$\alpha = 0.05$

$gl = n-1$

$$\text{Intervalo de Confianza}$$
$$\sqrt{\frac{(n-1) * s^2}{X_{1-\alpha/2}^2}} < \sigma_{\text{exp}} < \sqrt{\frac{(n-1) * s^2}{X_{\alpha/2}^2}}$$

Los valores de tablas de ji cuadrada se localizan en el anexo 2.

2.2 Reproducibilidad

2.2.1 Evaluación

2.2.2 Mediante el CV, que debe ser menor o igual al 2%.

2.2.3 Mediante un Análisis de Varianza

ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	grados de libertad	Suma de Cuadrados SC	Media de Cuadrados	F _{tab}
Analista A	a-1	$\frac{\sum Y_i^2}{bc} - \frac{Y^2}{abc}$	SC _A /gl _A	F _{0,95} gl = $\frac{a-1}{b-1}$
Días D	b-1	$\frac{\sum Y_i^2}{ac} - \frac{Y^2}{abc}$	SC _D /gl _D	F _{0,95} gl = $\frac{b-1}{a-1(b-1)}$
Interacción A-D	a-1(b-1)	$\frac{\sum Y_i^2}{c} - \frac{\sum Y_i^2}{bc} - \frac{\sum Y_i^2}{ac} + \frac{Y^2}{abc}$	SC _{AD} /gl _{AD}	F _{0,95} gl = $\frac{a-1(b-1)}{ab(c-1)}$
Error	ab(c-)	$\sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum Y_{ijk}^2}{c}$	SC _E /gl _E	

Factores de variación

-Analista (A); area de aceptación:

$$F_{exp_A} < F_{0,95_A}$$

-Día (D); area de aceptación:

$$F_{exp_D} < F_{0,95_D}$$

-Interacción Analista-Día (A-D); area de aceptación:

$$F_{exp_{AD}} < F_{0,95_{AD}}$$

Los valores de tablas de la distribución F se localizan en el anexo 2.

3. LINEARIDAD

3.1 Evaluación

3.1.1 Mediante el % Rec. a cada nivel ensayado y el global, debiendo de estar comprendidos los valores entre el 98% y el 102%.

3.1.2. Mediante CV a cada nivel evaluado y el total, para que se cumpla los valores deben de ser menores o iguales al 2%.

3.1.3 Por medio de una Regresión Lineal.

Cálculo de la pendiente (m)

$$m = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Cálculo de la ordenada al origen (a)

$$a = \frac{(\sum y) - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Cálculo del coeficiente de correlación (r)

$$r = \frac{\sum xy - \frac{n \bar{x} \bar{y}}{n}}{\sqrt{(\sum x^2 - \frac{n \bar{x}^2}{n})(\sum y^2 - \frac{n \bar{y}^2}{n})}}$$

donde:

x= mg. adicionados

y= mg. recuperados

n= número de datos

\bar{x} = media de los datos de mg adicionados

\bar{y} = media de los datos de mg recuperados

\bar{x}^2 =media al cuadrado de x

\bar{y}^2 =media al cuadrado de y

Ecuación que representa al Método:

$$y = a + mx + E_{ij} \quad \text{donde } E_{ij} \text{ es el Error Experimental.}$$

Cálculo del Error Experimental:

$$E_{ij} = \sum (y_i - \hat{y}_i) \quad \text{donde } \hat{y} \text{ es obtenida por la corrección}$$

de datos a partir de la recta.

Cálculo del Error típico de estimación ($\hat{s}_{y/x}$)

$$\hat{s}_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - a(\sum y) - b(\sum xy)}{n - 2}}$$

3.1.3.1 Evaluación de la Pendiente (m), con t de student.

Contraste de Hipótesis:

Ho Bo = 1

Ha Bo \neq 1

$$t_{exp} = \frac{(b - B_0) s_x \sqrt{n-1}}{\hat{s}_{y/x}}$$

Area de aceptación:

$$t_{\alpha/2} \leq t_{exp} \leq t_{1-\alpha/2} \quad \alpha=0.05 \text{ y } g1= n-2$$

lo anterior se debe de cumplir para aceptar Ho y considerar a la pendiente como 1.

3.1.3.2 Evaluación de la Ordenada al Origen (a), con t de student.

Contraste de Hipótesis:

H₀ A₀ = 0

H_a A₀ ≠ 0

$$t_{exp} = \frac{\hat{a} - A_0}{\hat{s}_{y/x} \sqrt{\sum x_i^2 / n - \bar{x}^2}}$$

Area de aceptación:

$$t_{\alpha/2} \leq t_{exp} \leq t_{1-\alpha/2} \quad \alpha=0.05 \text{ y } gl=n-2$$

al cumplirse lo anterior se acepta H₀ y se considera a la ordenada al origen del método como 0.

Si se cumple que m sea considerada como 1 y a como 0 el método reporta un comportamiento lineal.

4. LIMITE DE DETECCION

4.1 Evaluación

4.1.1 Se evalúa la cantidad adicionada contra cantidad recuperada, se efectúa la regresión lineal y con los datos obtenidos de pendiente (m), ordenada al origen (a), $\sum y$, $\sum y^2$ y $\sum xy$ se calcula el error típico de estimación ($\hat{s}_{y/x}$) el cual se multiplica por 1.96 que se debe de graficar paralelamente y el intercepto con el eje de la ordenada corresponde a la mínima cantidad detectada mediante el método evaluado.

ANEXO 2

TABLA I VALORES DE LA DISTRIBUION t DE STUDENT

TABLA II VALORES DE LA DISTRIBUCION F CON UNA
PROBABILIDAD ACUMULADA DE 0.95

TABLA III VALORES DE LOS PERCENTILES DE LA DISTRIBUCION
 J_1 CUADRADO

TABLA I

Tabla No. I

PERCENTILES DE LA DISTRIBUCION F^{**}

N ^o	$f_{0.10}$	$f_{0.20}$	$f_{0.30}$	$f_{0.40}$	$f_{0.50}$	$f_{0.60}$	$f_{0.70}$	$f_{0.80}$	$f_{0.90}$
1	0.1250	0.2270	1.376	3.078	6.3138	12.706	31.821	63.653	616.419
2	0.2883	0.6172	1.061	1.886	2.9200	4.3027	6.965	9.9248	11.598
3	0.2766	0.5840	0.978	1.638	2.3324	3.1825	4.541	5.8490	12.924
4	0.2703	0.5692	0.941	1.531	2.1318	2.7764	3.747	4.6041	8.610
5	0.2672	0.5598	0.920	1.476	2.0150	2.5706	3.365	4.0321	6.869
6	0.2648	0.5516	0.906	1.440	1.9432	2.4469	3.143	3.7074	5.959
7	0.2632	0.5491	0.896	1.435	1.8946	2.3644	2.998	3.4995	5.408
8	0.2619	0.5461	0.889	1.397	1.8395	2.306	2.876	3.1854	5.041
9	0.2610	0.5456	0.883	1.383	1.8311	2.2622	2.821	3.2498	4.781
10	0.2602	0.5416	0.879	1.372	1.8125	2.2281	2.764	3.1693	4.587
11	0.2596	0.5400	0.876	1.363	1.7939	2.2010	2.718	3.1058	4.437
12	0.2590	0.5387	0.873	1.356	1.7823	2.1788	2.681	3.0545	4.318
13	0.2586	0.5375	0.870	1.350	1.7709	2.1604	2.650	3.0123	4.221
14	0.2582	0.5366	0.868	1.345	1.7613	2.1448	2.624	2.9768	4.140
15	0.2579	0.5358	0.866	1.341	1.7530	2.1315	2.602	2.9467	4.073
16	0.2576	0.5358	0.865	1.337	1.7459	2.1199	2.583	2.9208	4.015
17	0.2574	0.5344	0.863	1.333	1.7396	2.1098	2.567	2.8982	3.965
18	0.2571	0.5338	0.863	1.330	1.7341	2.1009	2.552	2.8784	3.922
19	0.2569	0.5333	0.861	1.328	1.7291	2.0930	2.539	2.8609	3.883
20	0.2567	0.5329	0.860	1.325	1.7247	2.0860	2.528	2.8453	3.850
21	0.2566	0.5325	0.859	1.323	1.7207	2.0796	2.518	2.8314	3.819
22	0.2564	0.5321	0.858	1.321	1.7171	2.0739	2.508	2.8188	3.792
23	0.2563	0.5318	0.858	1.319	1.7139	2.0687	2.500	2.8073	3.767
24	0.2562	0.5315	0.857	1.318	1.7109	2.0639	2.492	2.7969	3.745
25	0.2561	0.5312	0.856	1.316	1.7081	2.0595	2.485	2.7874	3.725
26	0.2560	0.5309	0.856	1.315	1.7056	2.0555	2.479	2.7787	3.707
27	0.2559	0.5307	0.855	1.314	1.7033	2.0518	2.473	2.7707	3.690
28	0.2558	0.5304	0.855	1.313	1.7011	2.0484	2.467	2.7633	3.674
29	0.2557	0.5302	0.854	1.311	1.6991	2.0452	2.462	2.7564	3.659
30	0.2556	0.5300	0.854	1.310	1.6973	2.0423	2.457	2.7500	3.646
35	0.2553	0.5292	0.8521	1.3062	1.6956	2.0301	2.438	2.7239	3.619
40	0.2550	0.5286	0.8507	1.3031	1.6930	2.0211	2.433	2.7045	3.581
45	0.2548	0.5281	0.8497	1.3007	1.6904	2.0141	2.412	2.6896	3.5207
50	0.2547	0.5278	0.8489	1.2987	1.6879	2.0086	2.403	2.6778	3.4965
60	0.2545	0.5272	0.8477	1.2959	1.6857	2.0003	2.390	2.6603	3.4606
70	0.2543	0.5268	0.8468	1.2938	1.6839	1.9945	2.381	2.6480	3.4355
80	0.2542	0.5265	0.8462	1.2922	1.6821	1.9901	2.374	2.6388	3.4166
90	0.2541	0.5263	0.8457	1.2910	1.6810	1.9867	2.368	2.6316	3.4022
100	0.2540	0.5261	0.8452	1.2901	1.6802	1.9840	2.364	2.6260	3.3909
120	0.2539	0.5258	0.8446	1.2887	1.6777	1.9799	2.358	2.6175	3.3736
140	0.2538	0.5256	0.8442	1.2876	1.6758	1.9771	2.353	2.6114	3.3615
160	0.2538	0.5255	0.8439	1.2869	1.6753	1.9749	2.350	2.6070	3.3537
180	0.2537	0.5255	0.8436	1.2863	1.6751	1.9733	2.347	2.6035	3.3456
200	0.2537	0.5252	0.8434	1.2858	1.6752	1.9719	2.345	2.6006	3.3400
∞	0.2533	0.5244	0.8416	1.2816	1.6449	1.9600	2.326	2.5758	3.2905

* Los datos de esta tabla se han tomado, con permiso, de *Deming's Quality Control Tables*, 6th Ed., pp. 31-31.
 Gage Products Inc., Division of Gage Chemical Corporation, Arkley, N. Y.

ESTA TERCERA NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA II

Tabla No. II

PERCENTILES DE LA DISTRIBUCION F

		F_{α, v_1}								
f_1	f_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	181.4	199.3	215.7	224.6	230.2	234.9	236.8	238.9	240.5	
2	15.31	19.00	19.16	19.23	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	
3	10.13	9.35	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	
4	7.71	6.94	6.79	6.79	6.76	6.74	6.73	6.72	6.70	
5	6.61	5.79	5.61	5.49	5.43	5.39	5.37	5.36	5.35	
6	5.98	5.14	4.76	4.51	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	
7	5.39	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	
8	5.12	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	
9	4.96	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	
29	4.19	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.41	2.33	2.27	2.21	
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.13	
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	
60	3.64	3.08	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	

f_1 es el número de grados de libertad en el numerador.
 f_2 es el número de grados de libertad en el denominador.

TABLA III

PERCENTILES DE LA DISTRIBUCION II-CUADRADA

ϵ^2	$X^2_{.99}$	$X^2_{.95}$	$X^2_{.90}$	$X^2_{.85}$	$X^2_{.80}$	$X^2_{.75}$	$X^2_{.70}$	$X^2_{.65}$	$X^2_{.60}$	$X^2_{.55}$	$X^2_{.50}$
1	0.455	0.708	1.074	1.642	2.706	3.841	5.024	6.635	7.879	12.116	
2	1.384	1.833	2.408	3.219	4.603	5.991	7.378	9.210	10.597	15.202	
3	2.366	2.946	3.653	4.642	6.231	7.615	9.348	11.345	12.838	17.730	
4	3.357	4.045	4.878	5.989	7.779	9.408	11.343	13.277	14.668	19.998	
5	4.351	5.132	6.064	7.289	9.236	11.070	12.832	15.086	16.750	22.103	
6	5.348	6.211	7.231	8.558	10.645	12.592	14.449	16.812	18.548	24.101	
7	6.346	7.283	8.383	9.803	12.017	14.067	16.013	18.475	20.206	26.018	
8	7.344	8.351	9.524	11.030	13.362	15.507	17.335	20.090	21.955	27.868	
9	8.343	9.414	10.656	12.242	14.684	16.919	19.023	21.666	23.589	29.666	
10	9.342	10.473	11.781	13.442	15.987	18.307	20.483	23.209	25.188	31.419	
11	10.341	11.530	12.899	14.631	17.275	19.675	21.920	24.725	26.757	33.136	
12	11.340	12.584	14.011	15.812	18.549	21.026	23.336	26.217	28.300	34.821	
13	12.340	13.636	15.119	16.985	19.812	22.362	24.736	27.688	29.819	36.478	
14	13.339	14.685	16.222	18.151	21.064	23.685	26.119	29.141	31.319	38.109	
15	14.339	15.733	17.322	19.311	22.307	24.996	27.488	30.378	32.601	39.719	
16	15.338	16.780	18.418	20.465	23.542	26.296	28.845	32.000	34.267	41.308	
17	16.338	17.824	19.511	21.613	24.769	27.587	30.191	33.409	35.718	42.879	
18	17.338	18.868	20.601	22.760	25.989	28.869	31.576	34.805	37.136	44.434	
19	18.338	19.910	21.689	23.900	27.204	30.144	32.852	36.191	38.502	45.973	
20	19.337	20.951	22.775	25.038	28.412	31.410	34.170	37.566	39.997	47.498	
21	20.337	21.991	23.858	26.171	29.615	32.671	35.479	38.932	41.401	49.010	
22	21.337	23.031	24.939	27.301	30.813	33.924	36.781	40.289	42.766	50.511	
23	22.337	24.069	26.018	28.429	32.007	35.172	38.076	41.638	44.181	52.000	
24	23.337	25.106	27.096	29.553	33.196	36.415	39.364	42.980	45.538	53.479	
25	24.337	26.143	28.172	30.675	34.332	37.652	40.646	44.314	46.928	54.947	
26	25.336	27.179	29.246	31.795	35.563	38.885	41.923	45.642	48.290	56.407	
27	26.336	28.214	30.318	32.912	36.781	40.113	43.194	46.963	49.655	57.858	
28	27.336	29.249	31.391	34.027	37.916	41.337	44.461	48.278	50.993	59.300	
29	28.336	30.283	32.461	35.139	39.087	42.537	45.722	49.588	52.316	60.734	
30	29.336	31.316	33.530	36.250	40.256	43.773	46.979	50.892	53.632	62.161	
31	30.336	32.347	34.599	37.359	41.422	44.807	48.226	52.188	54.928	63.581	
32	31.336	33.378	35.667	38.467	42.585	45.830	49.473	53.473	56.216	64.992	
33	32.336	34.408	36.734	39.574	43.737	46.842	50.718	54.748	57.484	66.392	
34	33.336	35.438	37.799	40.680	44.884	47.844	51.963	56.013	58.759	67.787	
35	34.336	36.467	38.859	41.778	46.059	48.802	53.203	57.342	60.275	69.188	
40	39.335	41.622	44.165	47.269	51.805	55.758	59.342	63.691	66.766	76.095	
45	44.335	46.781	49.452	52.729	57.505	61.656	65.410	69.933	73.188	82.836	
50	49.335	51.892	54.723	58.164	63.167	67.505	71.420	76.134	79.400	89.561	
60	59.335	62.135	65.226	68.972	74.397	79.082	83.298	88.379	91.952	102.695	
70	69.334	72.358	75.689	79.715	85.527	90.531	95.023	100.425	104.215	115.572	
80	79.334	82.566	86.120	90.405	96.578	101.879	106.679	112.329	116.321	128.261	
90	89.334	92.761	96.524	101.054	107.565	113.149	118.136	124.116	128.299	140.781	
100	99.334	102.946	106.906	111.667	118.498	124.342	129.561	135.806	140.169	153.165	
120	119.334	123.289	127.616	132.806	140.233	146.567	152.211	158.950	163.688	177.602	
140	139.334	143.604	148.269	153.854	161.827	168.613	174.648	181.840	186.846	201.682	
160	159.334	163.848	168.876	174.828	183.311	190.516	196.915	204.530	209.824	223.480	
180	179.334	184.111	189.646	195.743	204.708	212.304	219.084	227.056	232.620	249.044	
200	199.334	204.434	209.985	216.609	226.021	233.994	241.058	249.445	255.264	272.427	

Las bases de esta tabla se han tomado, con permiso, de *Deming's Geom. Stochast. Tables*, 2^a Ed., pp. 16, 17, *Pharmaceutical Division of Geigy Chemical Corporation, Ardsley, N. Y., and Hialeah, A. S. - A. Table of Percentages Points of the χ^2 -Distribution*, *Journal of the American Statistical Association*, 33, 166-173, 1930.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAG
No. 1 Representación del cromatograma de Captopril	31
No. 2 Cromatograma 1, Especificidad de Captopril	35
No. 3 Cromatograma 2, Especificidad de Captopril	35
No. 4 Cromatograma 3, Especificidad de Captopril	36
No. 5 Cromatograma 4, Especificidad de Captopril	36
No. 6 Cromatograma 5, Especificidad de Captopril	37
No. 7 Representación del cromatograma de Nifedipina.	42
No. 8 Cromatograma de la Especificidad para Nifedipina	45
No. 9 Cromatograma de la Especificidad para Nifedipina	45
No.10 Cromatograma de la Especificidad para Nifedipina	46

INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA	PAG
No. 1 Barrido espectrofotométrico de Captopril	33
No. 2 Barrido espectrofotométrico de Nifedipina	47
No. 3 Curva de Linearidad del Mét. cromato. para Nifedip.	61
No. 4 Curva del Limite de Detección del Mét. cromato.	62

INDICE DE TABLAS

TABLA	PAG
No. 1 Condiciones cromatograficas experimentales de Captopril.	32
No. 2 Valores de Rf para la Especificidad de Captopril	34
No. 3 Evaluación de Especificidad a Tem. amb. para Captopril	38
No. 4 Evaluación de Especificidad a 37°C para Captopril.	39
No. 5 Evaluación de Especificidad a 45°C para Captopril.	40
No. 6 Evaluación de especificidad a 60°C para captopril.	41
No. 7 Condiciones cromatograf. experimen. de Nifedipina.	43
No. 8 Valores de Rf para la Especificidad de Nifedipina.	44
No. 9 Evaluación de Especificidad para Nifedipina L-A, TA.	48
No.10 Evaluación de Especificidad para Nifedipina L-A, 30°C.	49
No.11 Evaluación de Especificidad para Nifedipina L-A, 37°C.	50
No.12 Evaluación de Especificidad para Nifedipina L-B, TA.	51
No.13 Evaluación de Especificidad para Nifedipina L-B, 30°C.	52
No.14 Evaluación de Especificidad para Nifedipina L-B, 37°C.	53